GE Healthcare

Biacore

Biacore 2000

Ver. 3

Instrument Handbook

日本語取扱説明書

JJ-3002-06
(71-3201-31)

目 次

1.セットアップ

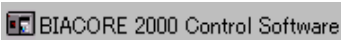
1-1. 電源およびソフトウェアの起動

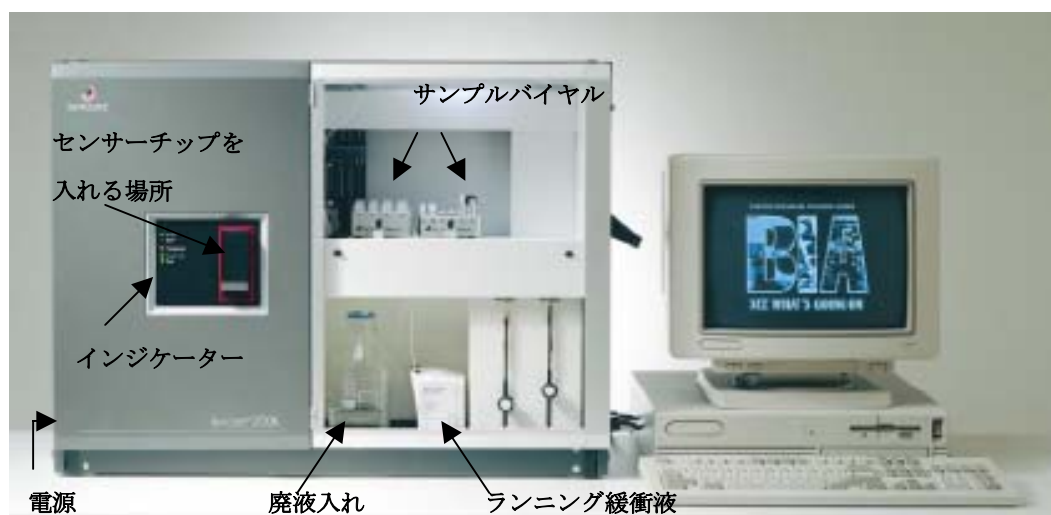
1-1-1. 電源の立ち上げおよびランニング緩衝液の準備

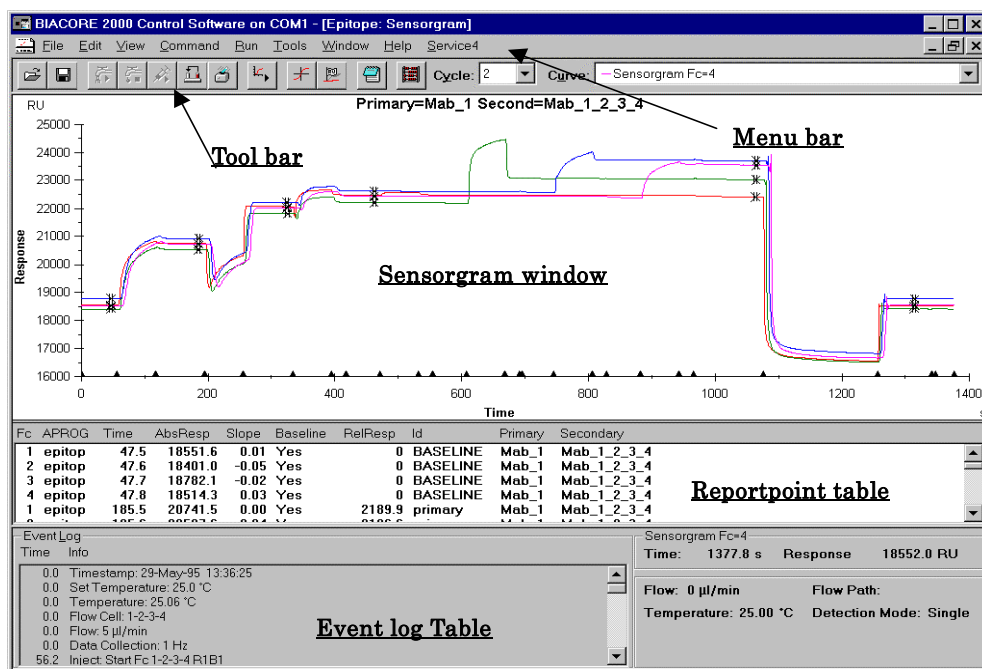
定電圧電源装置 → プリンター → モニター画面 → システム本体 → コンピューター の順番に電源を入れる。

↓

本体のフロントパネル上の左にあるインジケータ（ライト）が点灯し、30 秒程でリセット後、新たに必要事項のみが点灯あるいは点滅する。

↓

Biacore 本体のドアを開け、本体右側下部の細い 2 本のインレットチューブをランニング緩衝液のボトルに、太いシリコンチューブを廃液入れの空ボトルに入れる。

装置の配置

1-1-2. コントロールソフトウェアの起動

モニターの初期画面中の左下のスタートを押し、**BIA programs** をクリックし、**Biacore 2000 Control Software** のアイコン（ BIACORE 2000 Control Software ）をクリックする。

画面の説明

● Menu bar

Biacore の全ての操作コマンドが含まれている。

● Toolbar

使用頻度の高いコマンドをアイコン化しており、簡便にコマンド操作を選択できる。

● Sensorgram window

センサーグラムをリアルタイムに表示。

● Report point table

指定した時間におけるレスポンスを数字で表示。結合量の表示等に使用。

● Eventlog window

測定中の操作内容を表示。グラフの X 軸上の（▲）と対応。

● Status window

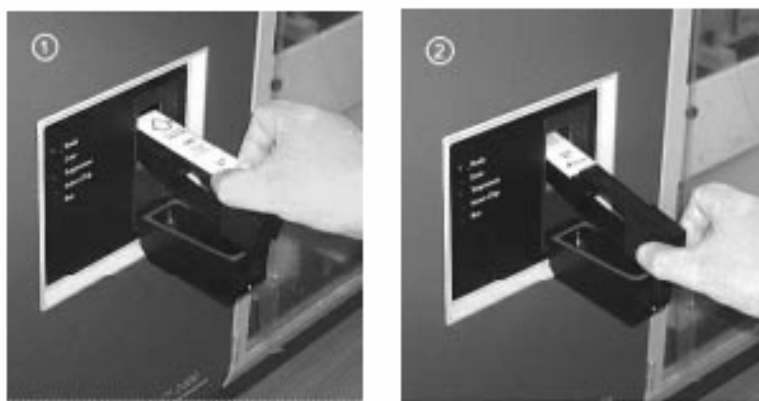
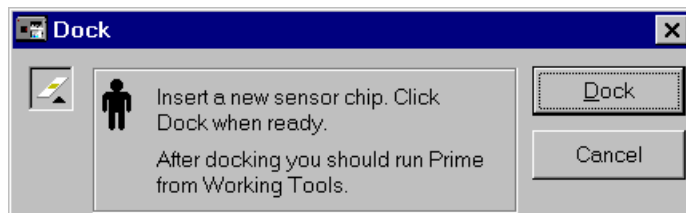
現在のシステムの状態を表示。

時間 、レスポンス（RU） 、流速 、使用フローセル 、温度 、Run 実行状態

1-2. システムの初期化

1-2-1. センサーチップの挿入（Dock）

ソフトウエアを立ち上げると **Dock** ボックスが自動的に表示される。

↓

黒のカバーを開け、コンベアを手前に引く。コンベアによって引かれてきたガイドピンにセンサーチップシートのホールが組み合わさるようにセンサーチップをセットし、コンベアを押し込み、カバーを戻す。
(フロントパネルのインジケータの Sensor chip のシグナルが緑色に点滅する)

↓

Dock ボックスの **Dock** をクリックする。
(フロントパネルのインジケータの Sensor chip のシグナルが緑色の点灯に変わる)

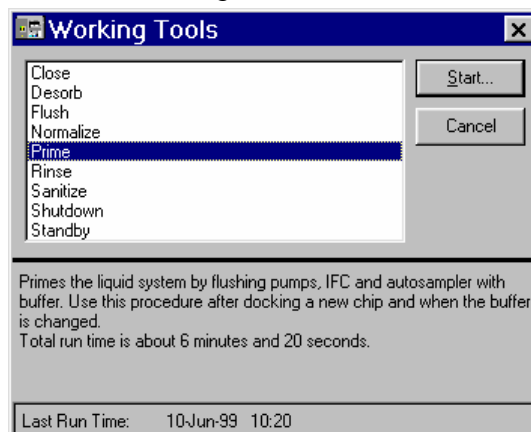
補足 1. Dock 時の注意事項・解説

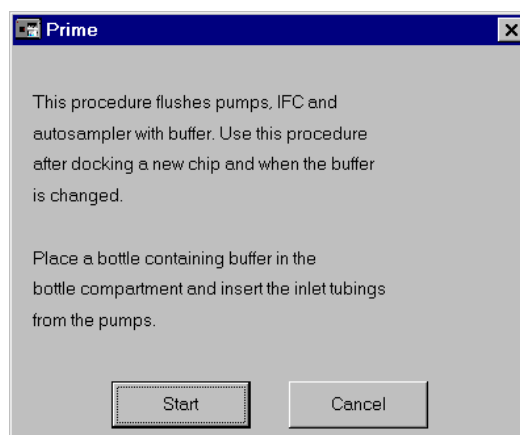
① センサーチップ内のプラスチックシートがセンサーチップのカバーにしっかり収まっていることを確認してから挿入する。
② センサーチップを冷蔵庫から取り出した場合には、室温に戻した後、包装あるいは容器から取り出すようにする。
③ センサーチップの交換は必ず Undock の状態で行う。インジケータの Sensor chip が Dock 状態（本体シグナルが緑色の点灯時）に、強引にセンサーチップを抜かないようにする。

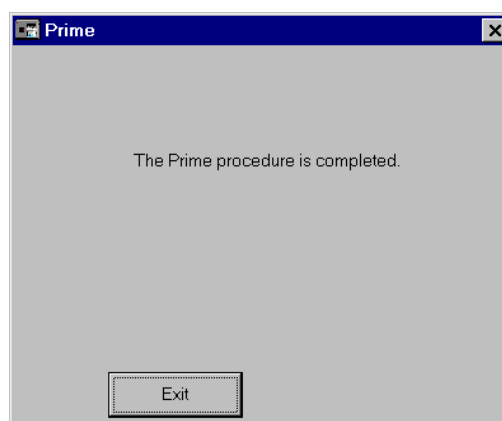
センサーチップには以下の種類がある。

(1) **CM5**：カルボキシルメチルデキストランをコーティングしたチップ。アミンカップリング、チオールカップリング、アルデヒドカップリング等の固定化に利用する汎用性の高いチップ。
Research Grade:ロット間の固定化量の誤差が 15%以下のチップ。
通常の実験に使用できる。
Certified Grade:ロット間の固定化量の誤差が 5%以下のチップ。品質管理等で長期に渡る精密な実験を組む場合等に使用する。
(2) **CM4**：CM5 のカルボキシルメチルデキストラの導入量を減少させたチップ。カルボキシル基にイオン交換的に非特異的結合する塩基性物質を含むサンプルを用いる場合に使用する。
(3) **CM3**：CM5 のカルボキシルメチルデキストラを短くしたチップ。巨大分子（細胞、細菌、ファージ等）の固定化や、添加して相互作用測定をおこなう場合に利用する。
(4) **C1**：　金表面に直接カルボキシル基のみを導入したチップ。CM3 と同様に、巨大分子（細胞、細菌、ファージ等）を用いる場合に使用する。比較的非特異的結合が多い。
(5) **SA**：　ストレプトアビジンをあらかじめ固定化してあるカルボキシルメチルデキストランベースのチップ。ビオチン化した DNA、ペプチド、化合物等ビオチン化分子の固定化に使用する。
(6) **NTA**: NTA をあらかじめ固定化してあるカルボキシルメチルデキストランベースのチップ。ヒスチジンタグを持つ発現タンパク質（His-Tag Fusion Protein）を Ni^{2+}を介して固定化できる。
(7) **HPA**：　金表面にオクタデシル基（C18）を導入したチップ。疎水性の高い表面で、リン脂質や糖脂質などをリポソームとして添加することで、単層（monolayer）で固定化できる。
(8) **L1**: 疎水性分子をあらかじめ固定化してあるカルボキシルメチルデキストランベースのチップ。リン脂質や糖脂質などをリポソームとして添加することで、2 重膜（bilayer）で固定化できる。糖脂質、リン脂質や膜貫通型レセプター等の固定化に使用できる。

1-2-2. ランニング緩衝液の置換（Prime）

Dock 操作終了後、自動的に Working Tools の **Prime** が選択される。

ランニング緩衝液および廃液入れを確認後、**Start...**をクリックする。

↓

内容を確認後、**Start** をクリックする。

↓

Prime 終了後、**Exit** をクリックする。

補足 2. Prime における注意事項・解説

① このボックスは、**Tools → Working Tools** の操作で開くことができる。
Prime は、新しくセンサーチップを挿入した時やランニング緩衝液を交換する時に行い、ポンプやマイクロ流路系,オートサンプラー等をランニング緩衝液で洗浄、置換する操作である。

② ランニング緩衝液として、弊社から HBS 緩衝液を販売している。
HBS-EP
10 mM HEPES /0.15 M NaCl/3 mM EDTA/0.005 % Surfactant P 20（pH7.4）
フィルターろ過、脱気済み

HBS-P
10 mM HEPES /0.15 M NaCl/0.005 % Surfactant P 20（pH7.4）
フィルターろ過、脱気済み

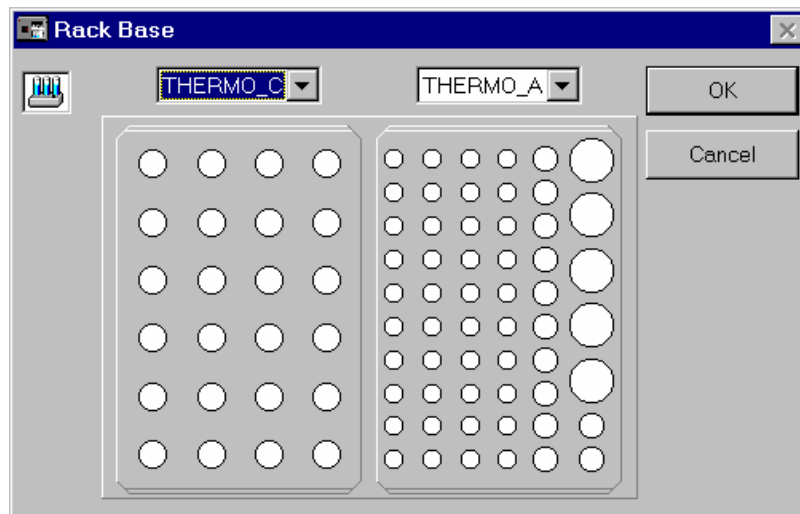
HBS-N
10 mM HEPES /0.15 M NaCl（pH7.4）
フィルターろ過、脱気済み

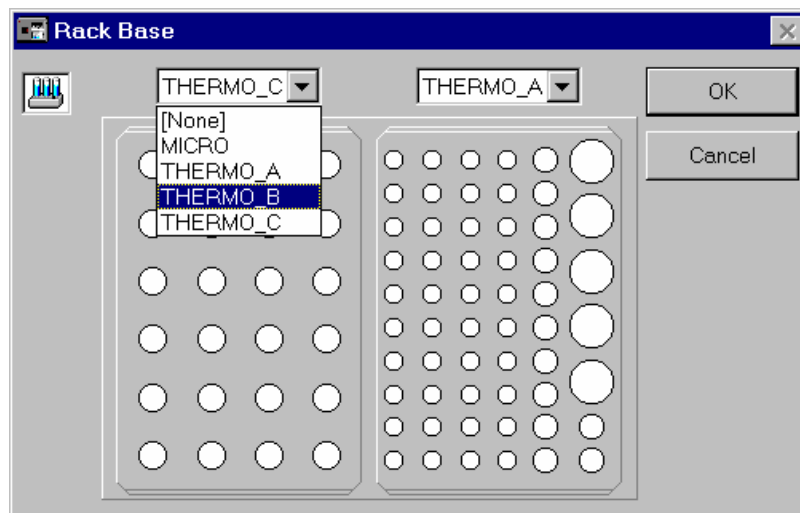
実験目的にあわせ、緩衝液の変更は自由であるが、各自で調製する場合には、0.22μm フィルターでろ過を行い、さらに十分脱気を行う。また、CM5 センサーチップ使用の場合は、リガンドの固定化終了時まで、アミン系の緩衝液(トリスあるいはグリシン緩衝液等)は使用しない。

1-2-3. ラックの設定

使用するラックの設定を行う。

Command → **Rack Base...**をクリックする。

↓

ラックに変更がある場合には、▼をクリックし選択する。

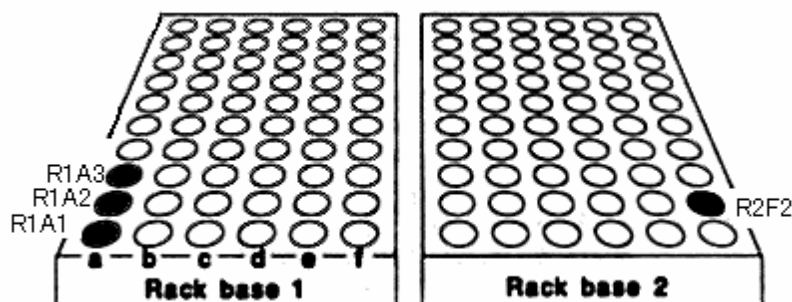
↓

OK をクリックする。

各ラックと使用できるバイヤルについては、8 ページを参照のこと。

補足 3.ラックの設定における注意事項・解説

ラックベースは向かって左側が Rack Base1、右側が Rack Base2 となる。
各ラックには次のバイヤルがセットできる。

・Thermo__A　7 mm プラスチックバイヤル
　9 mm ガラスバイヤル
　0.5 ml 容マイクロチューブ
　16 mm ガラスバイヤル
・Thermo__B　9 mm のガラスバイヤル
　0.5 ml 容マイクロチューブ
・Thermo__C　2 ml プラスチックバイヤル
　1.5 ml 容マイクロチューブ
・MICRO 96 穴のマイクロタイタープレート

ラックのサンプルの位置は以下のように指定される。

ラックベースは向かって左側が Rack Base1、右側が Rack Base2 となる。たとえば、左側のラックの "a" の列の手前の 1 番目から 3 番目のサンプル（黒く塗りつぶした位置）は、それぞれ R1A1、R1A2、R1A3 となる。また、右側のラックの "f" の列の 2 番目のサンプル（黒く塗りつぶした位置）は、R2F2 となる。マイクロタイタープレート（96 穴）の場合にも同様な方法で設定する。

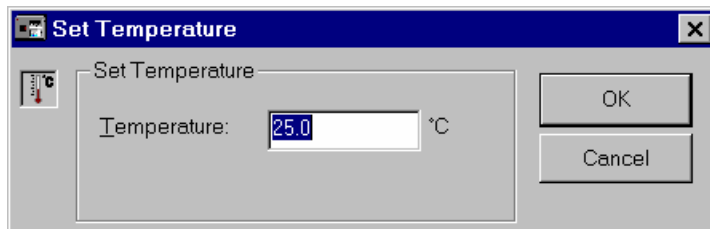
<u>マイクイロチューブを使用する場合の注意事項</u>

① チューブの底がラックの穴の底に届くものを使用する。
② ニードルはラックの穴の中央に下りる。チューブのエッジがぶつからないものを使用する。
③ 蓋付のチューブは、蓋を切り取るかニードルがぶつからないように注意する。

1-2-4. 温度設定

フローセルを含む検出器部位の温度の設定を行う。

Command → **Set Temperature...**をクリックする。

↓

4～40℃の範囲で設定し、**OK** をクリックする。

補足 4. 温度設定における注意事項・解説

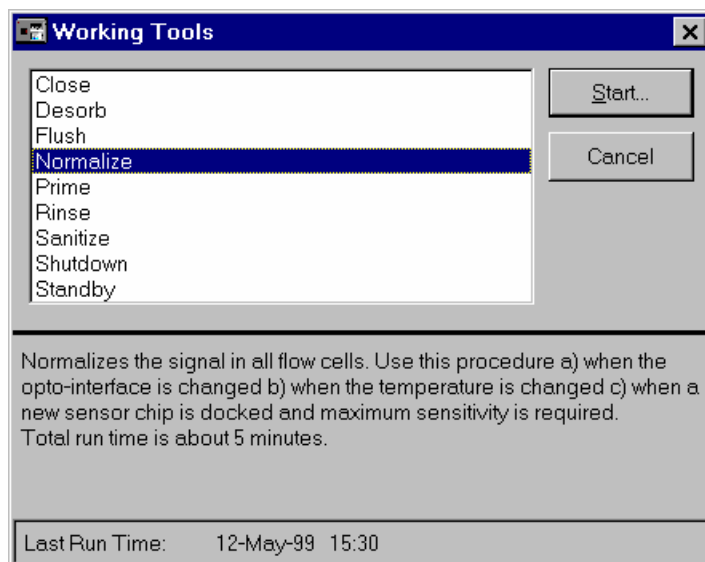
①温度設定は 4～40℃で設定できる。

②設定温度に達していない場合、画面上の states window 中の温度の表示が赤の点滅、本体インジケータの Temperature のシグナルが橙色の点滅をする。設定温度に達し温度が安定した場合には、画面上の温度の表示が黒、インジケータは点灯に変わる。

③温度が安定するまでに比較的時間がかかるので、室温から離れている場合は、早めに設定する。5□温度変更する場合、約 1 時間を要する。

④サンプルラックの温度を調整する場合は、恒温循環槽のチューブを本体右側面のノズルに接続する。この時、専用のアダプターを使用する。

1-2-5. SPR シグナルの校正（Normalize）

BIAmaintenance kit 中の **BIAnormalize solution 0.5 ml** を **R2F2** にセットし、**Tools** → **Working Tools...** → **Normalize** をクリックする。

溶液をセット後、**Start...**を実行する。

補足 5. Normalize における注意事項・解説

この操作は、SPR シグナルの校正を行うものである。
以下の場合に実行する。

① 設定温度を変更した場合。
② 最大感度を得たい場合。

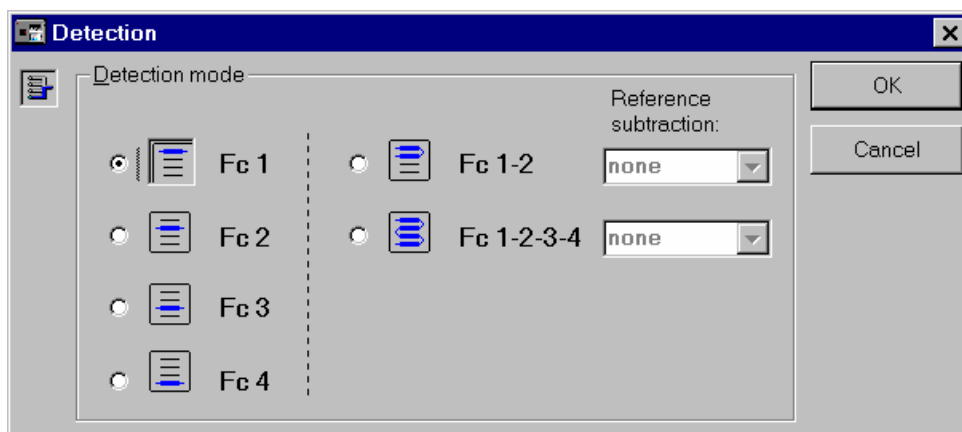
温度が安定してから行う。

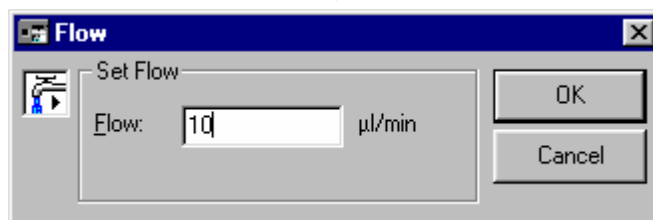
2.基本操作（マニュアル操作）

ここでは、基本的なマニュアル操作の解説をする。
試料として Sucrose 溶液を使用し説明する。
（試料）
① 2% Sucrose
② 4% Sucrose
③ 8% Sucrose
④ 16% Sucrose

2-1. 試料の添加

試料（100 μl）をそれぞれラックにセットする。

アイコン（ ）あるいは **Run** → **Run sensorgram...**をクリックし、センサーグラムをスタートする。

Detection mode の選択後、**OK** をクリックする。

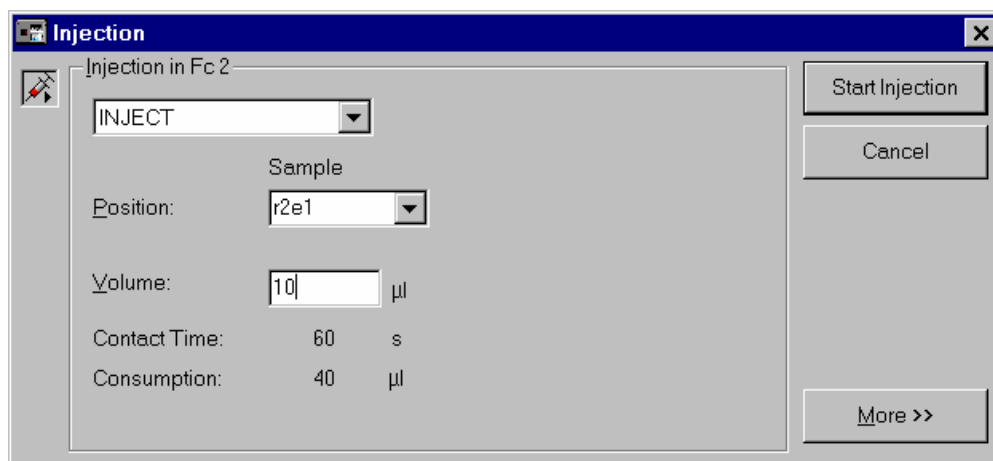
↓

流速（1～100μl/min）を入力後、**OK** をクリックする。

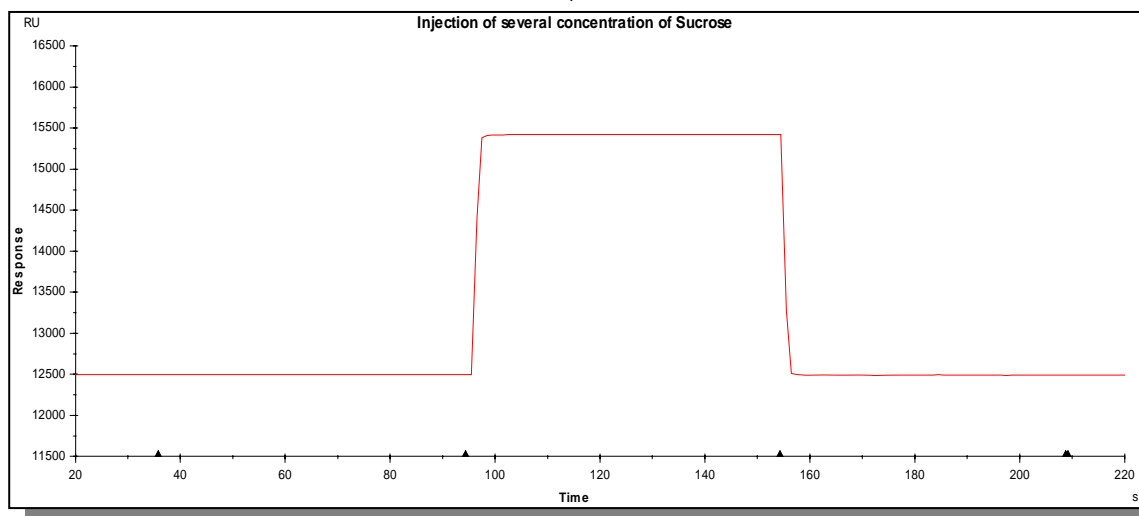
↓

（センサーグラムが表示され測定が開始される）

↓

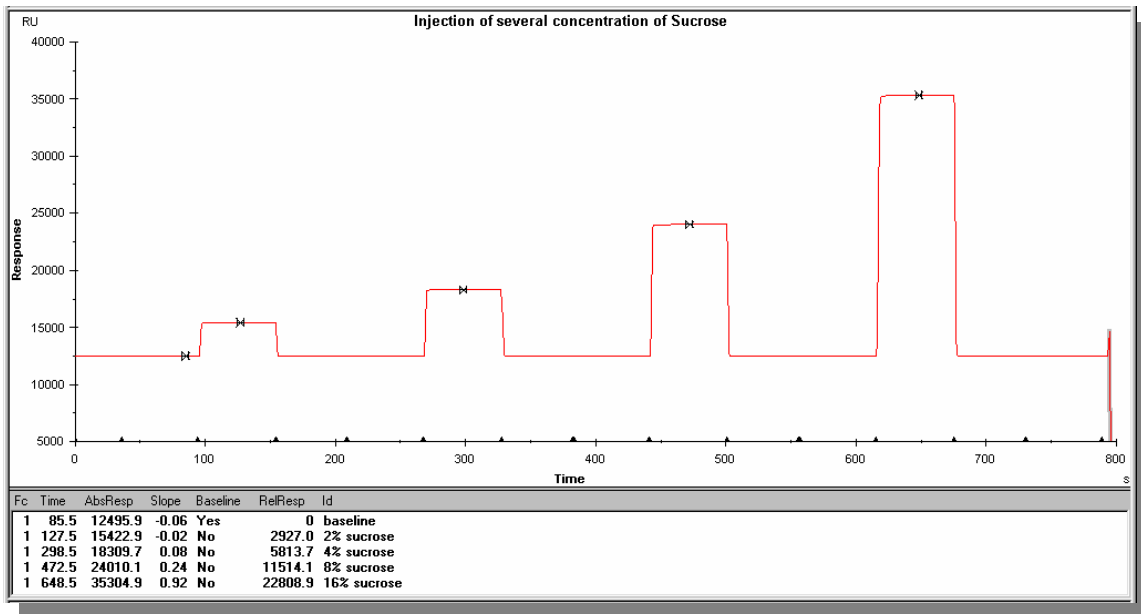
アイコン （ ） あるいは **Command** → **Inject...**をクリックする。

↓

サンプルの位置および容量（10 µl 程度）を入力し、**Start Injection** をクリックする。

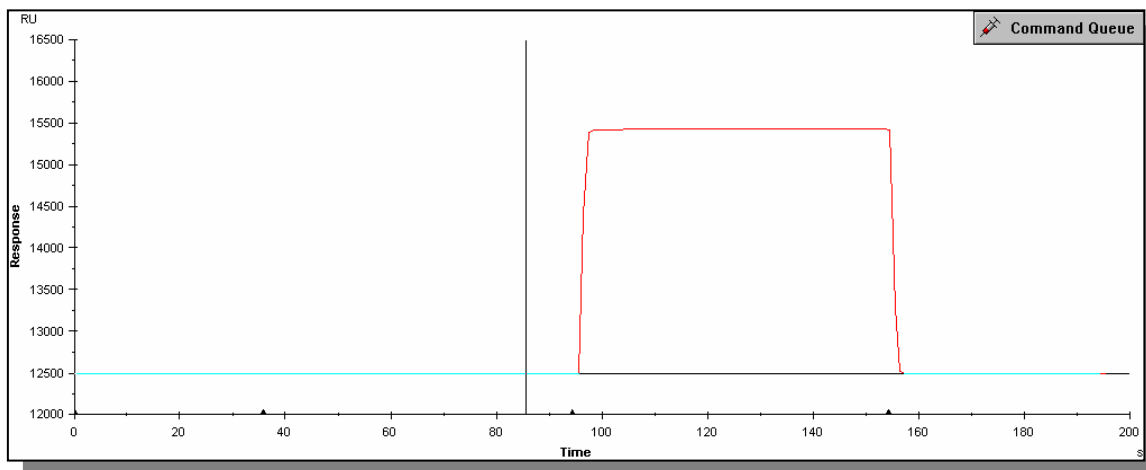
↓

2%Sucrose の添加

↓

引き続き次の試料を添加する。

↓

全てのサンプルの添加が終了したら、アイコン（ ）もしくは **Run** → **Stop Sensorgram** をクリックし、測定を終了する。

2-2. レポートポイントの取り方

センサーグラム上の任意の時間におけるレスポンス（RU）を下のレポートポイントテーブルに表示させることができる。

アイコン（　）あるいは **View** → **Reference Line** をクリックし、センサーグラム上にリファレンスラインを表示させる。

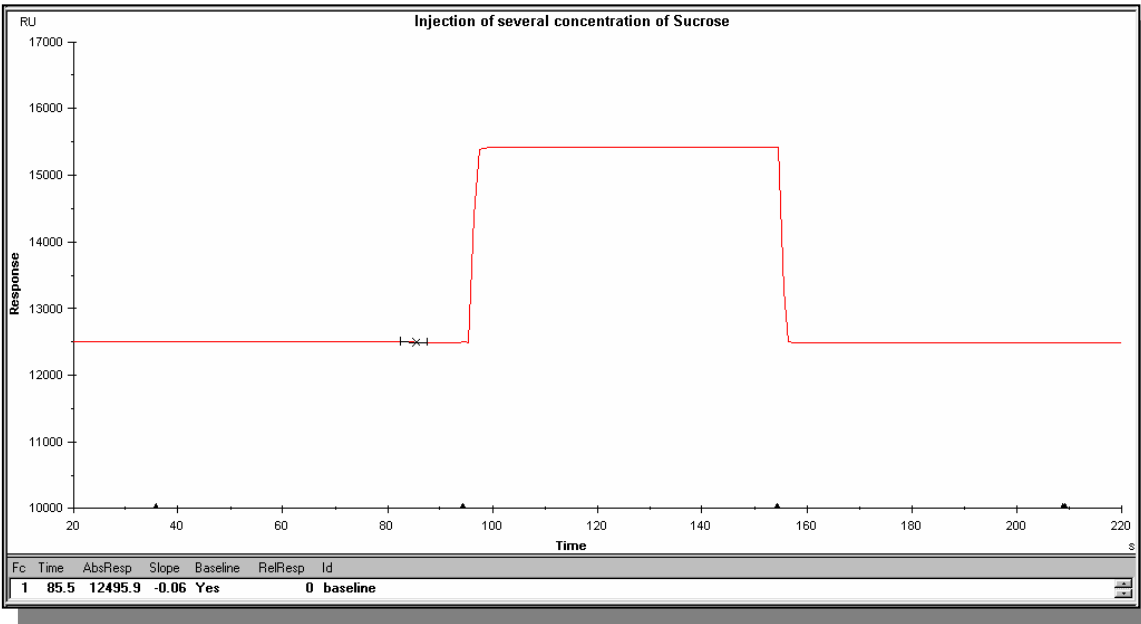
↓

マウスのカーソル（矢印）をリファレンスラインの縦線上に移動後、マウスの左ボタンをドラックし、レポートポイントを取りたい時間に移動するか、もしくはレポートポイントを取りたい場所のセンサーグラム上の位置でカーソルをクリックし、リファレンスラインを移動する。

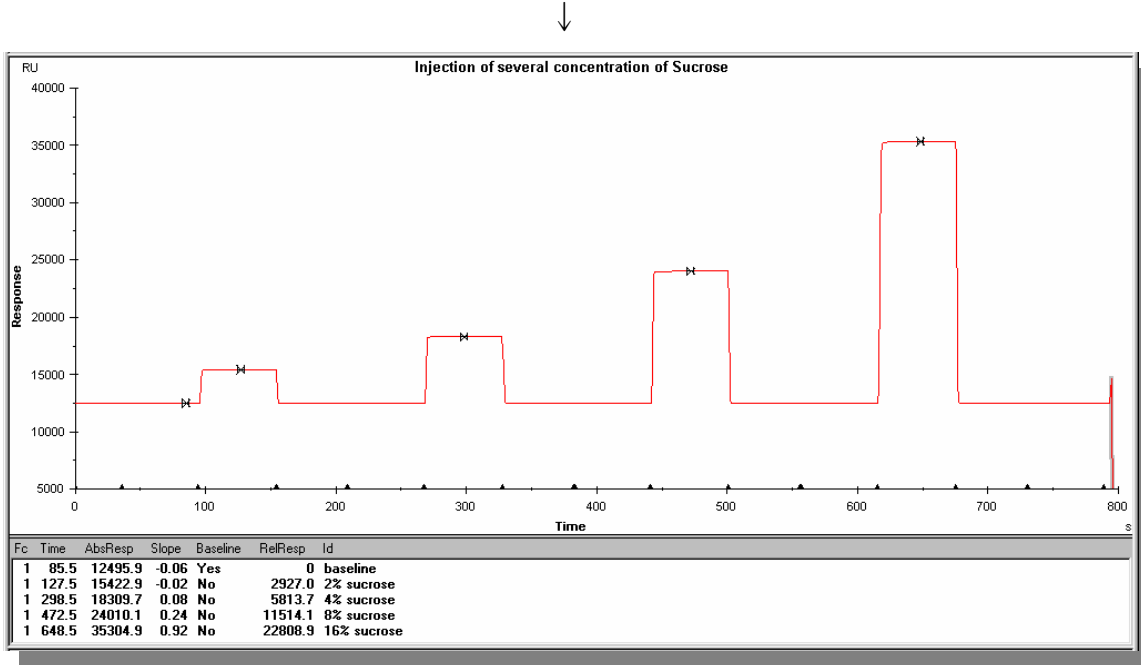
アイコン（　）あるいは **Edit** → **Add Report Point** をクリックする。

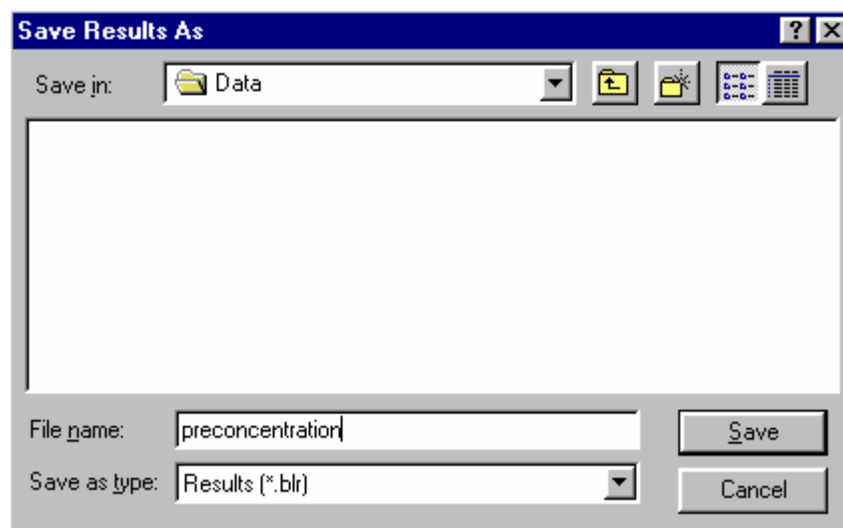
↓

Id:の欄にコメントを入力する。その時のレスポンスをベースライン（基準値0RU）とする場合には、Baseline のチェックボックスにチェックを入力すると、レポートポイントテーブル中の相対値（RelResp）の値が 0 になる。

↓

リファレンスラインを次のポイントに移動後、同様にレポートポイントをとると、ベースラインからの相対値（RelResp）が表示される。

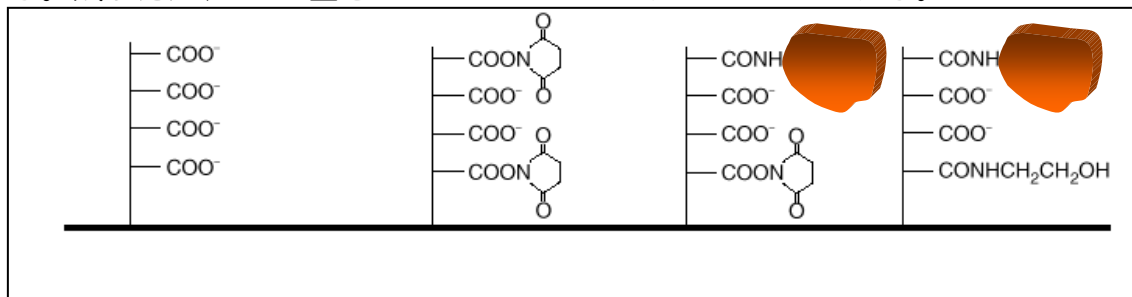
さらに必要な場所のレポートポイントを作成する。

↓

2-3. ファイルの保存

得られたセンサーグラムを保存するには、**File** → **Save As** を選択する。

Save in：で、**C**：＼**Bia Users**＼（自分のフォルダー）に移動後、ファイル名を入力し、**Save** をクリックする。

3.リガンドの固定化

リガンド
相互作用を検討する分子のうち、固定化する分子を「リガンド」と言う。リガンドの精製度は、リガンド結合の特異性やキャパシティーに大きく作用するので非常に重要である。90%以上の精製度のリガンドを使用する。

リガンドの固定化方法 1
センサーチップ CM5 を使用してリガンドを固定化する場合には以下のような方法がある。
CM5 に固定化するリガンドは、主にタンパク質、ペプチド、低分子化合物である。
① アミンカップリング
リガンド表面に存在するアミノ基（N 末端アミノ基あるいはリジン ε-アミノ基）を利用して固定化する方法。
CM デキストランのカルボキシル基を NHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）で活性化し、プレコンセントレーションを利用して濃縮したリガンドを固定化する。残った活性 NHS 基をエタノールアミンでブロッキングする。

② チオールカップリング（176 ページ参照）
● リガンドチオールカップリング
リガンドの表面に存在する遊離型チオール基を用いて固定化する方法。
● サーフェスチオールカップリング
センサー表面にチオール基を導入し、リガンドのカルボキシル基を介して固定化する方法。
③ アルデヒドカップリング（166 ページ参照）
大量の糖鎖を持つムチンタンパク質等の固定化をする方法。糖鎖の非還元末端をメタ過ヨウ素酸により解裂させアルデヒド基を作成し、ヒドラジンによりアミノ基を導入したセンサーチップにシッフ塩基で固定化する方法。

<u>リガンドの固定化方法 2</u>
センサーチップ SA を使用してリガンドを固定化する場合には以下のような方法がある。
SA に固定化するリガンドは、主にビオチン化核酸、ビオチン化ペプチド、ビオチン化タンパク質である。
末端ビオチン標識したリガンドを適当な緩衝液に希釈(1～10 μg/ml)し、そのまま添加して固定化を行う。50 ベース以上の核酸を固定化する場合には、荷電の影響を少なくするために、食塩を 150mM 以上添加する。

ここでは、固定化法として汎用されるアミンカップリングを中心に記載する。

（準備するもの）
・アミンカップリングキット（GE ヘルスケア バイオサイエンス社製）
・ランニング緩衝液（トリスあるいはグリシン緩衝液等の 1 級アミンを含まないもの）
・リガンド（アジ化ナトリウム等の求核性物質を含まないもの）
・リガンド希釈液（リガンドの等電点よりも 1～2 低い pH の 10mM 酢酸緩衝液）

リガンドの等電点が不明な場合には、21,86 ページのプレコンセントレーション操作を行いリガンド希釈液の pH を決める。

● アミンカップリングキット
アミンカップリングキットには、以下の試薬が含まれている。
EDC(N-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochroride)
NHS(N-hydroxysuccinimide)
1 M ethanolamine hydrochloride 溶液(pH 8.5)
（試薬の調製方法）
キットに添付されている説明書に従い、EDC および NHS はそれぞれ 10 ml の MilliQ 水に溶解し、直ちに 200 μl ずつを 7mm プラスティックバイヤル（弊社発売）にそれぞれ小分けし、蓋をして使用直前まで-20℃で冷凍保存する。使用に際して 1 組ずつの試薬を取り出し、溶解後使用する。溶解後の試薬の再凍結はできない。エタノールアミンは、溶液で供給されており、4 ℃で保存する。200μl ずつ小分けしておくか、使用する直前にサンプリングする。

● リガンド希釈液

タンパク質の固定化

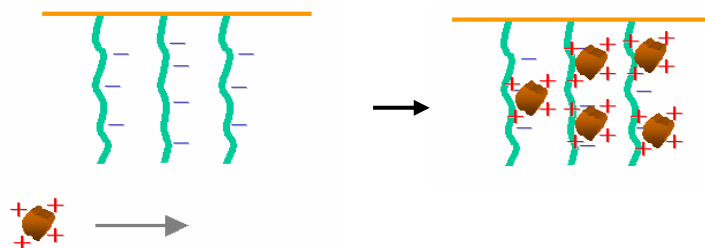
リガンド濃度は通常5～200 μg/ml程度になるよう10mM酢酸緩衝液で希釈して固定化を行う。酢酸緩衝液のpHはリガンドの等電点より1～2低いpHか、21,86ページに示したプレコンセントレーション検討後決定したpHを用いる。また、リガンド希釈用緩衝液は非アミン系で比較的低塩濃度（10 mM）のものを使用する。希釈用緩衝液はpH3.5以下のものは使用しない。プレコンセントレーション効果が見られない場合（ペプシン等の酸性タンパク質）は、ビオチン化後、SAチップに固定化するか、サーフェスチオールカップリングを用いる。

ペプチドや低分子物質の固定化

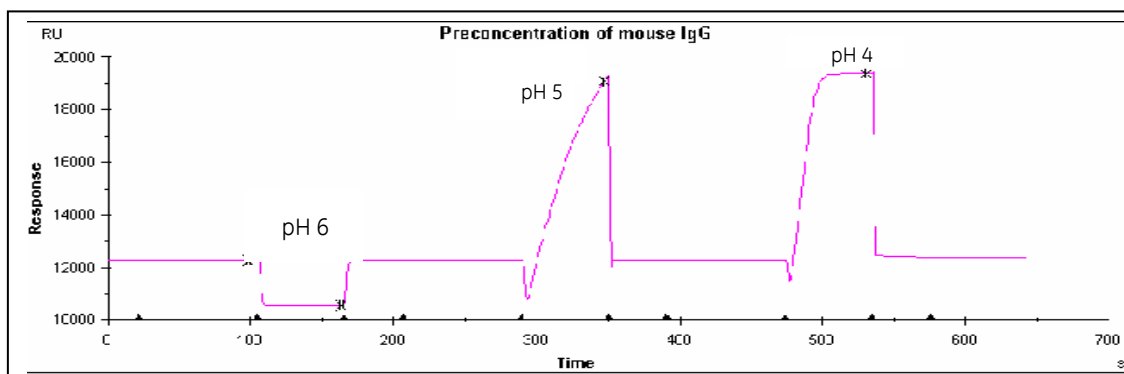
リガンドがペプチドや化合物等の低分子の場合は、プレコンセントレーションの効果が見られない場合がある。この場合は、弱アルカリ性条件で固定化を行う。プレコンセントレーション効果を利用する代わりに、高濃度のリガンド溶液を使用する。活性型NHS基とアミノ基とのカップリング効率は、pH8.5前後がもっとも高いので、このpH付近で固定化を行う。希釈液として、10 mMホウ酸緩衝液（pH 8.5）を使用し、サンプル濃度は100 μg/ml以上の比較的高濃度で固定化する。

3-1. マニュアル操作によるプレコンセントレーションの検討

プレコンセントレーションとは？

固定化操作において、センサー表面の CM デキストランに存在するカルボキシル基は非常に重要である。リガンドを正に荷電した状態でインジェクトすると、負に荷電している CM デキストランとの間に静電気的な相互作用が生じ、リガンドをデキストラン中に濃縮することができる。この方法を用いることで固定化効率を上昇させることができる。したがって、リガンドは等電点よりも低い pH の緩衝液に希釈し、リガンドを正に荷電させる必要がある。等電点が既知のサンプルの場合は、リガンドの等電点よりも 1～2 低い pH 条件を使用すれば良いが、等電点が不明な場合には、「プレコンセントレーションの検討」を行って、固定化に適する pH を調べることができる。この操作は、何も処理していないフローセルを使用し、各 pH におけるセンサー表面へのリガンドの濃縮の程度を見るものである。

サンプル調製例

リガンドを最終濃度で 5～50 μg/ml になるよう各緩衝液で希釈する。

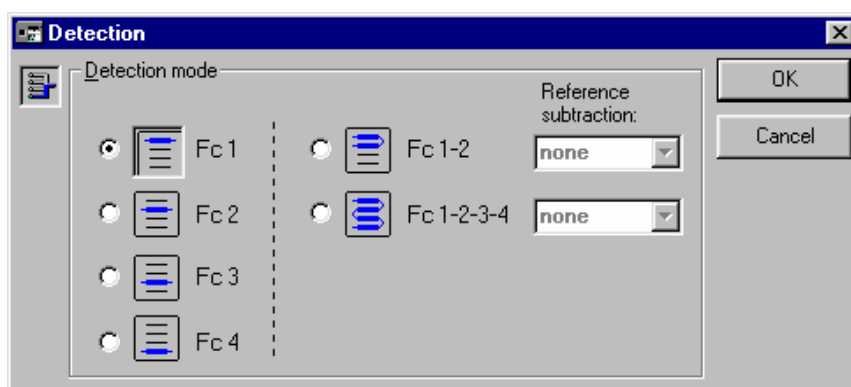
- 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 6）　100 μl
- 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5）　100 μl
- 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 4）　100 μl

この操作によりリガンドは固定化されることはない。添加終了後、ランニング緩衝液に置換された後に、速やかに解離する。しかし、リガンドがデキストランに非特異的吸着を起こすこともあり、リガンド添加終了後、引き続き洗浄溶液（50mM　NaOH）30 秒程度添加する。プレコンセントレーションに使用したフローセルは洗浄後固定化に利用することができる。（この操作は Application Wizard を用いて行うこともできる。86 ページ）

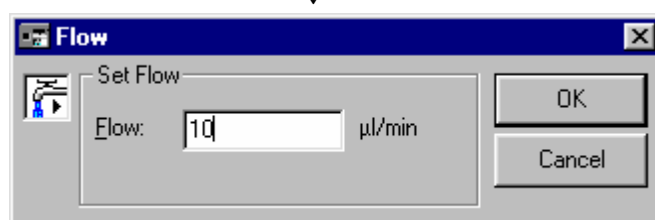
サンプル調製例
リガンドを最終濃度で 5～50 µg/ml になるよう各緩衝液で希釈する。

- 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 6） 100 µl
- 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5） 100 µl
- 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 4） 100 µl

サンプルをラックにセットする。

↓

アイコン（）あるいは **Run → Run Sensorgram...**をクリックし、センサーグラムをスタートする。

使用する流路を選択し、**OK** をクリックする。

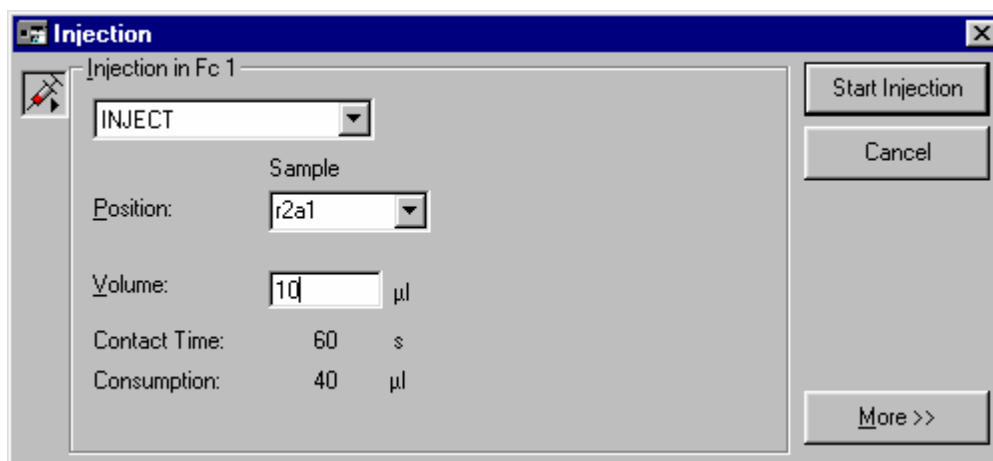
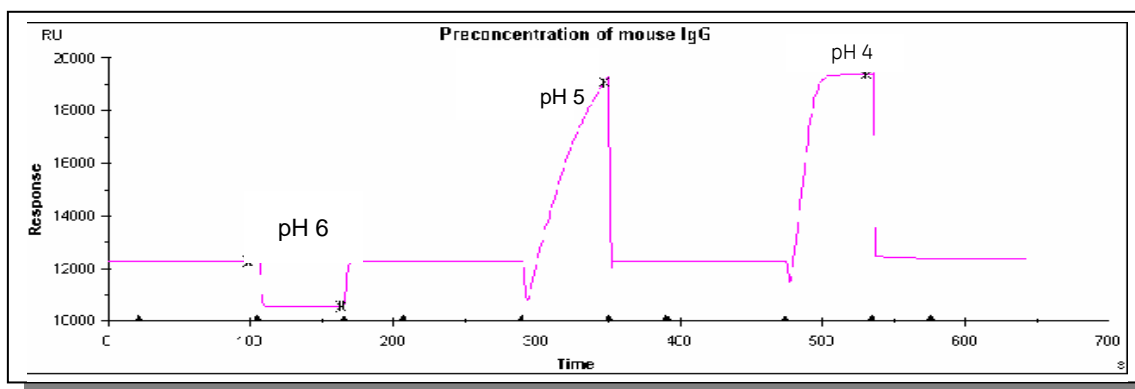
↓

流速を 10 µl/min に設定し、**OK** をクリックする。

↓

アイコン（）あるいは **Command → Inject...**をクリックする。

↓

サンプルの位置、容量（µl）を入力し、**Start Injection** をクリックする。

↓

引き続き、残りのサンプルも同様に添加する。

mouse IgG のプレコンセントレーション

↓

アイコン（ ）もしくは **Run → Stop sensorgram** をクリックし、測定を終了する。

補足 6.プレコンセントレーションの評価について

プレコンセントレーション効果は、希釈緩衝液の pH を下げれば増加する。しかし、低い pH 環境下では、活性型 NHS 基とアミノ基とのカップリング効率は減少する。上記のセンサーグラムの場合、pH4 の方が pH5 に比べ速い速度でプレコンセントレーションしているが、活性化 NHS 基とアミノ基のカップリング効率は、pH8.5 前後が至適であるため、必ずしも pH4 で固定化量が多いとは限らない。また、タンパク質の安定化のためにはできるだけ高めの pH を使用すべきである。したがって、濃縮効果のある、一番高い pH 条件を使用する。上記の場合、pH5 が妥当である。

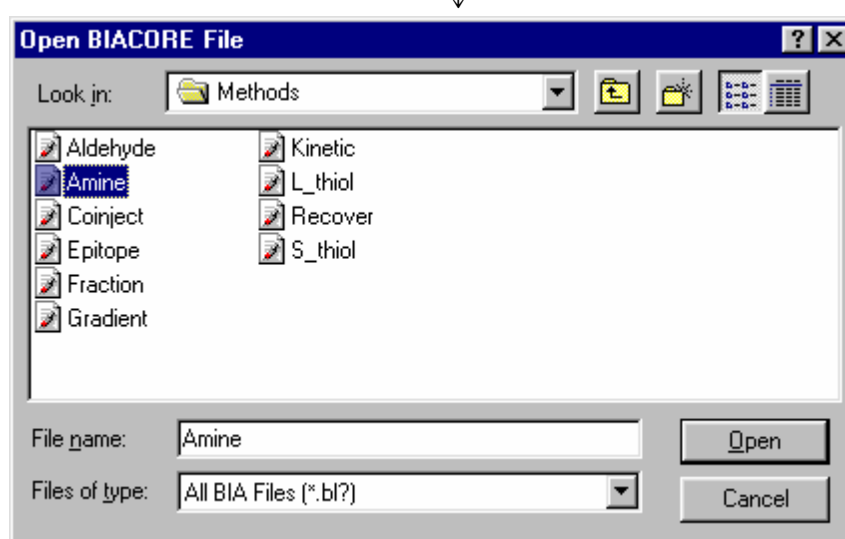
3-2. プログラム操作によるリガンド固定化

リガンドのアミンカップリングについて記載する。固定化は、マニュアル操作、プログラム操作および Application Wizard（92 ページ参照）で行うことができるが、ここでは、プログラム操作によるリガンドの固定化について記載する。
プログラムの詳細については、61 ページ参照のこと。

3-2-1. ファイルの呼び出し

アイコン（　）あるいは **File** → **Open...**をクリックする。

↓

↓

C：＼Program File＼BIACORE 2000＼Guide＼Methods のフォルダーを開け、アミンカップリングのプログラムファイルである **Amine** を選択し、**Open** クリックする。

以下のプログラムが表示される。

（固定化プログラム）

```
DEFINE APROG immob
CAPTION Amine coupling                              ！グラフのタイトル
        FLOW         10                             ！流速 10µl/min
        DILUTE       R2B1 R2B2 R2B3 50              ！NHS/EDC の混合液の作成
  *     INJECT       R2B3 70                        ！NHS/EDC 混合液の添加
-0:10   RPOINT       Baseline –b                    ！レポートポイントの取得
 8:00   INJECT       R2A1 70                        ！リガンドの添加
  *     INJECT       R2B4 70                        ！エタノールアミンの添加
        RPOINT       immob                          ！レポートポイントの取得
END

MAIN    RACK 1       thermo_b                       ！ラックの設定
        RACK 2       thermo_a                       ！ラックの設定
        DETECTION    2                              ！検出フローセルの設定
        APROG        immob                          ！immob の実行
        APPEND       standby                        ！Standby の実行
END
```

（試薬およびサンプルの位置）

R2A1 ： リガンド（至適な pH の酢酸緩衝液に希釈したもの）
R2B1 ： NHS（もしくは EDC、冷凍庫から取り出し溶解直後のもの）
R2B2 ： EDC（もしくは NHS、冷凍庫から取り出し溶解直後のもの）
R2B3 ： 空容器（7 mm プラスチックバイヤル）
R2B4 ： エタノールアミン

このプログラムは、**1** つのフローセルにリガンドを固定化する方法である。
4 つのフローセルに同じリガンドを固定する場合や、別々のリガンドを固定化する際のプログラムを作成する場合には、プログラムの説明（**75～77** ページ）を参照すること。

（コマンドの説明）
詳しいプログラムの解説は 61 ページを参照すること。

FLOW　10
流速を 10µl/min に設定している。

DILUTE　R2B1 R2B2 R2B3 50
R2B1 のサンプルと R2B2 のサンプルを等量とり、R2B3 で混合液を調製する。ここでは、EDC と NHS の混合液を作成している。この操作によって、混合液が 200µl 作成される。**50** は R2B1 の混合割合が 50％であることを示している。

*　INJECT　R2B3 70
調製した混合液を 70µl 添加し、センサー表面を活性化する。
添加時間 7 分。7 分間の添加で CM デキストランのカルボキシル基のおよそ 40％が活性化されることになる。目的によって時間を増減する。残存カルボキシル基を少なくする場合には、この活性化時間を長くする。活性化時間と固定化量との関係は、約 10 分間まで比例関係である。

INJECT　R2A1 70
R2A1 の位置にあるリガンドを 70µl 添加し、カップリングを行う。添加時間 7 分。
サンプルは添加量 ＋30µl（この場合は 100µl）を用意する。

*　INJECT　R2B4 70
R2B4 の位置にある 1 M エタノールアミンを 70µl 添加し、残余の活性型 NHS 基をブロッキングする。EDC と NHS の混合液の添加時間と同じ時間添加する。
サンプルは添加量 ＋30µl（この場合は 100µl）を用意する。

3-2-2. プログラムの編集

プログラム内容は自由に変更することができる。さらに、変更したプログラムのコマンドの文字を全部大文字にし、行をそろえることができる。

Edit → **Adjust Method** → **Second** あるいは **Minute** をクリックする。

```
   define aprog immob
   caption immobilization
   flow 5
   dilute r2b1 r2b2 r2b3
   *inject r2b3 35
-0:10 rpoint baseline -b
   end
            ↓（Edit → Adjust  Method → Minute すると）

   DEFINE APROG immob
            CAPTION immobiilization
            FLOW         5
                     DILUTE r2b1 r2b2 r2b3
          *INJECT  r2b3 35
-0:10       RPOINT       baseline -b
   END
```

と変更される。

補足 7. プログラムの編集における注意事項・解説

① プログラムは大文字と小文字のどちらを使用してもかまわない。また、コマンドとコマンドの間隔は 1 スペース以上で任意である。

② レポートポイントの時間表示を秒表示にする時には Second を、また、分表示にする時には Minute を選択する。

③ C：＼Program Files＼BIACORE 2000＼Guide＼Methods 中にあるオリジナルプログラムは上書きしないようにする。変更したプログラムを保存する場合には、Bia Users 下の自分のフォルダーに保存する。

3-2-3. エラーの検索

作成したプログラム中に言語等の誤りがあるかを検索する。

Run → **Prerun Method** をクリックする。

エラーがある場合には以下の様なメッセージが現れる。

↓

エラーの内容が表示されるので、OK をクリック後、訂正する。
（上下のメッセージは消去する必要はない。）

```
>> Expected: '1','2','3','4','1,2,3,4','2-1,4-3','2-1,3-1,
 4-1','2-1','1,2'
 DETECTION    5

 >>
```

もう一度 **Prerun Method** を実行する。
何もエラーが表示されない場合には、エラーがないことを示している。

補足 8. エラーの検索における注意事項・解説

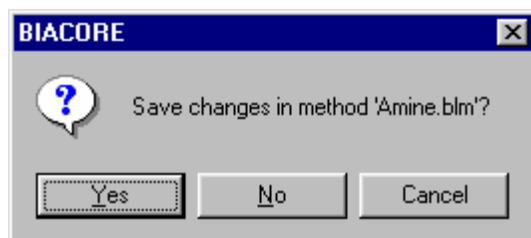
① 実際にセットしたサンプルの位置の認識はしないので、サンプル位置は間違えないように確認する。
② プログラム実行前には必ず（ **Run** → **Prerun Method** ）を実行する。

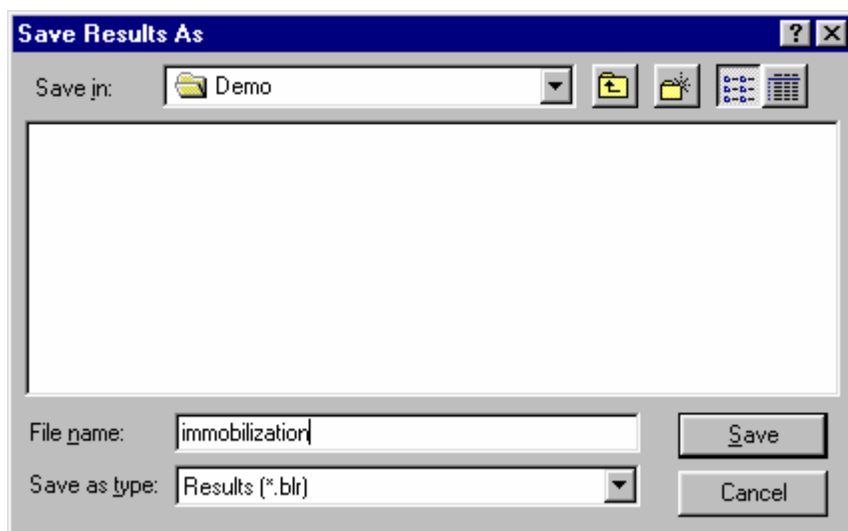
3-2-4. プログラムの実行

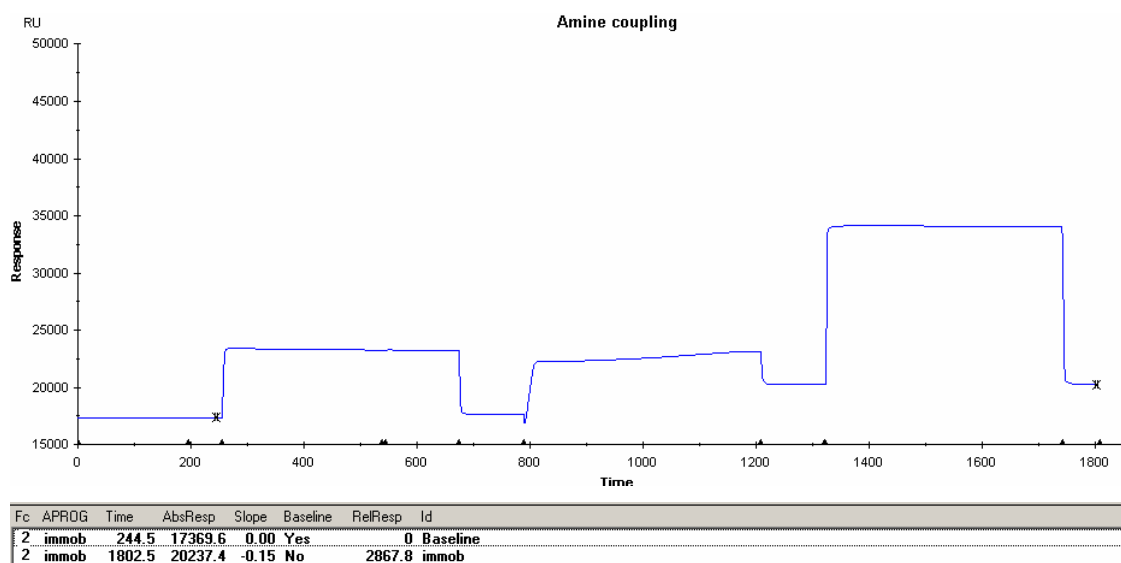
Run → **Run Method** をクリックする。

↓

呼び出してきたプログラム（Amine.blm）の内容を書き直した場合、以下のメッセージが表示される。

↓

ここで"Yes"をクリックすると元のファイルが上書きされる。オリジナルプログラムは書き換えないよう注意する。 "**No**"をクリックする。

↓

結果の保存先を各自のフォルダーに指定し、ファイル名を入力し、**Save** をクリックする。

Fc	APROG	Time	AbsResp	Slope	Baseline	RelResp	Id
2	immob	244.5	17369.6	0.00	Yes	0	Baseline
2	immob	1802.5	20237.4	-0.15	No	2867.8	immob

（固定化のセンサーグラム）

補足 9. プログラムの実行における注意事項・解説

① プログラムを保存しなかった場合でも、その時使用したプログラムは Result ファイルと一対で保存される。レザルトファイルを開き、**View** → **Method...** をクリックすれば、プログラムを見ることができる。また、そのプログラムを再実行することも可能である。

② Biacore のファイル名には、以下の拡張子が付いており、拡張子の種類からどれに属するファイル名か確認できる。

ファイル名 **.blm**　:Program ファイル
ファイル名 **.blr**　:Result ファイル
ファイル名 **.ble**　:BIAevaluation software で編集、解析したファイル

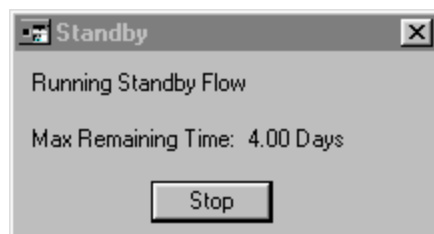
（重要）
実行後にプログラムを強制終了したい場合には、キーボードの

Ctrl（左下） ＋ **Break**（右上）

を同時に押し、緊急停止する。

3-2-5. プログラムの終了

プログラムが終了すると、**Standby** 状態になる（プログラムの MAIN ボックスの APPEND Standby による）。

↓

Stop をクリックし、Standby を停止する。
データは、先に入力したファイル名で保存されている。

補足 10. 固定化量に関する注意事項

固定化量は実験の目的によって調節する必要がある。

① 特異的結合の確認実験

特異的な結合を確認するだけの実験には、アナライトのレスポンスが十分得られるような固定化量があればよい。感度を良くするためには固定化量を多くする方が理想的である。低分子アナライトの場合には、リガンドの固定化量を十分に多くする必要がある。

リガンドの固定化量とアナライトのレスポンスとの関係は、それぞれの分子量によって決まる。固定化したリガンドにアナライトが最大どれだけ結合するか以下の式で算出することができる。

アナライトの結合量（最大結合量 **Rmax**）
=アナライトの分子量 **(Da) ×** リガンドの固定化量（**RU**）**/**リガンドの分子量 **(Da) × s**
s はリガンドの結合部位数

（例）	リガンドの分子量	50,000 Da
	リガンド固定化量	1,000 RU
	リガンド結合部位数	1
	アナライト分子量	20,000

の場合、アナライトの最大結合量（Rmax）以下の値となる。

アナライトの最大結合量（Rmax）= 20,000 × 1,000 / 50,000 × 1 = 400RU

Biacore で相互作用を測定するためには、リガンドがタンパク質の場合、Rmax は最低でも **100RU** 程度は必要であるので注意する。

② 濃度測定

濃度測定を行う場合には、固定化量はできるだけ多くする。目安としては 10,000 〜15,000RU 程度は固定化したい。固定化量を多くするとスタンダードサンプルを使用した際の検量線の直線性がより高くなる。

③ 反応速度定数（結合速度定数（k_a）、解離速度定数(k_d)）の算出

反応速度定数（Kinetics Parameter）を算出する場合には、マストランスポートリミテーションの影響を抑えるため、固定化量（RU）はできるだけ下げる必要がある。至適な固定化量は以下の式から得られた最小固定化量と最大固定化量の間を目安にする。

（最小固定化量）　**200 × 1/S ×** （リガンドの分子量／アナライトの分子量）
（最大固定化量）　**1000 × 1/S × (**リガンドの分子量／アナライトの分子量）
S はリガンドの結合部位数

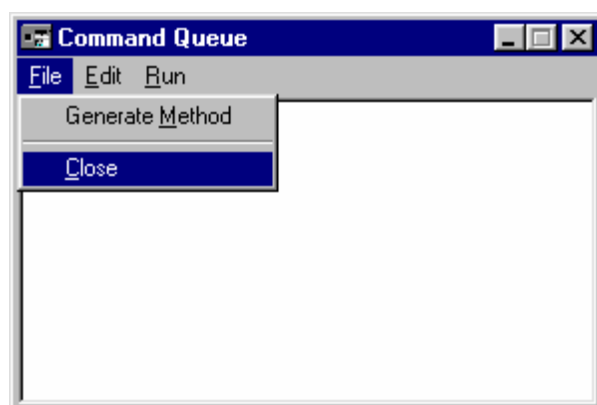
例えば、50 kDa のリガンドと 120 kDa のアナライトを使用する場合のリガンドの固定化量は（S=1 として）、
最小固定化量　200 × 1/1×（50,000/120,000）＝ 83 RU　から
最大固定化量　1000 × 1/1×（50,000/120,000）＝ 417 RU　の間となる。
固定化量を調節する場合には、MANUAL INJECT を使用すると便利である（32 ページ参照）。

3-3.　固定化量を調節しながらの固定化

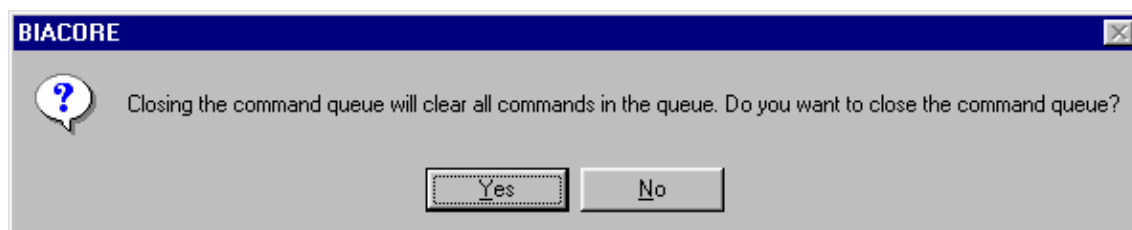
MANUAL INJECT コマンドは、サンプルの添加を小刻みに繰り返すことのできる添加方法であり、この方法を使用することで、厳密な固定化量の調節を行うことができる。この操作は全ての段階をマニュアル操作で行う必要がある（プログラム操作では行えない）。NHS 活性化やエタノールアミンブロッキング時は通常の INJECT コマンドを使用し、リガンドの添加時にのみ MANUAL INJECT コマンドを使用する。

アイコン（　）あるいは **Run** → **Run Sensorgram** をクリックし、センサーグラムをスタートさせる（11 ページ参照）。

MANUAL INJECT コマンドを使用する場合には、予め **Command Queue** 機能を解除する。

画面上の **Command Queue** をクリックする。

File → **Close** をクリックする。

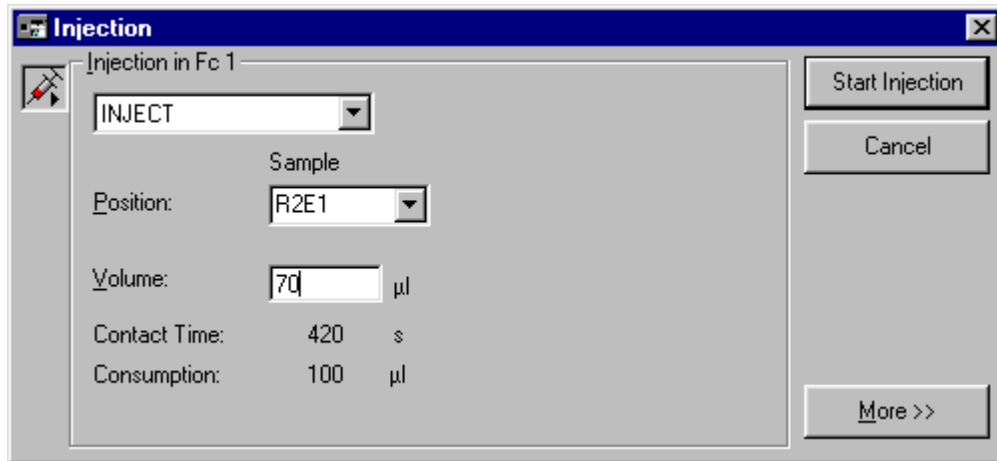
Yes をクリックする。

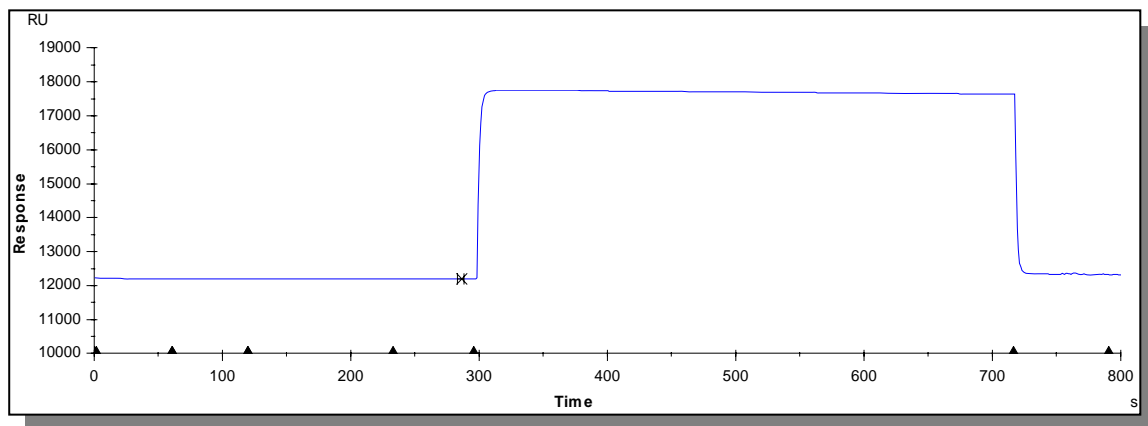
↓

画面上から **Command Queue** が消える。

(1) NHS 活性化
NHS/EDC の当量混合液（自分で混合する）をラックにセットする。

↓

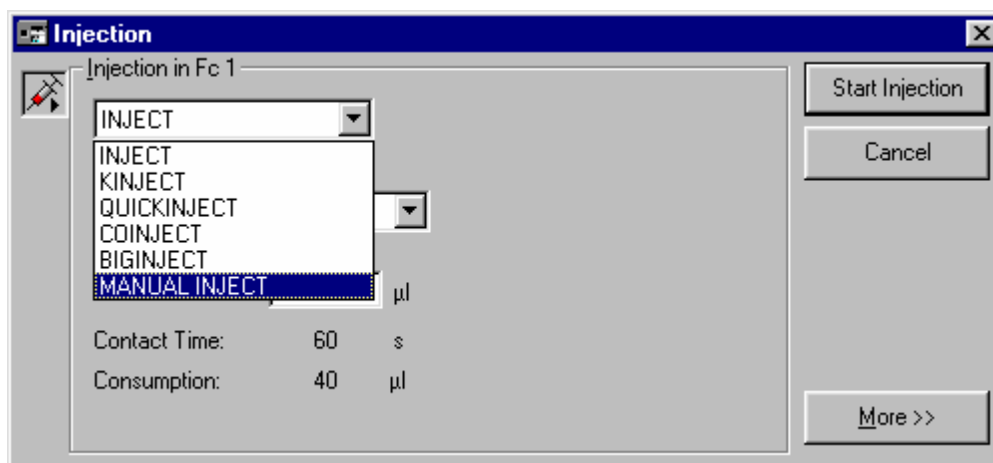
アイコン（　）あるいは **Command** → **Inject...**をクリックする。

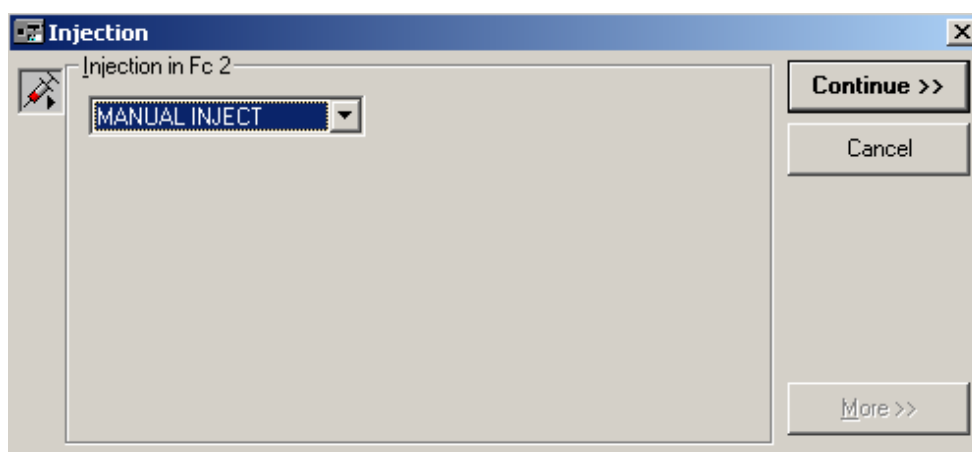
↓

サンプル位置および添加容量を入力し、**Start Injection** をクリックする。
（7 分間活性化が基本となる）

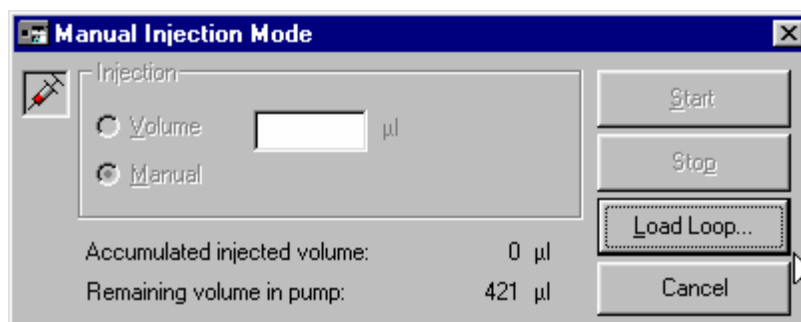
↓

NHS 活性化反応が行われる。

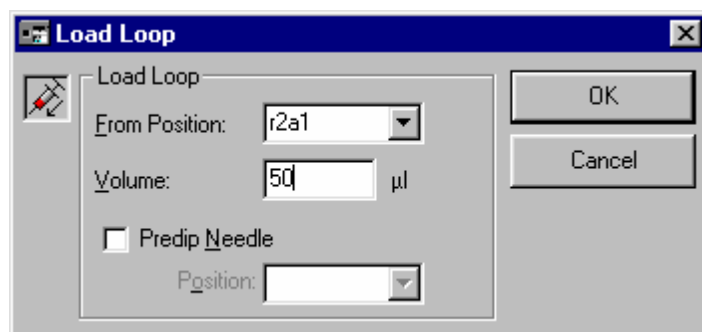
↓

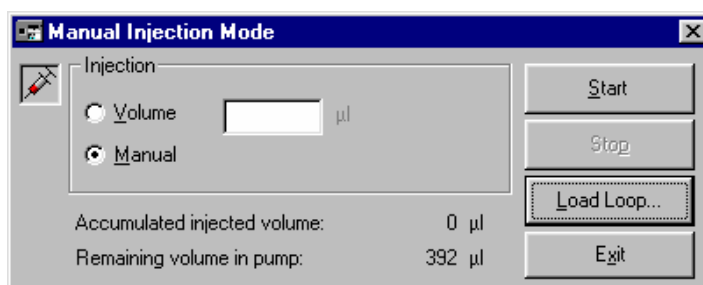
(2) リガンドのカップリング

アイコン（ ）あるいは **Command** → **Inject...**をクリックする。

MANUAL INJECT を選択し、**Start Injection** をクリックする。

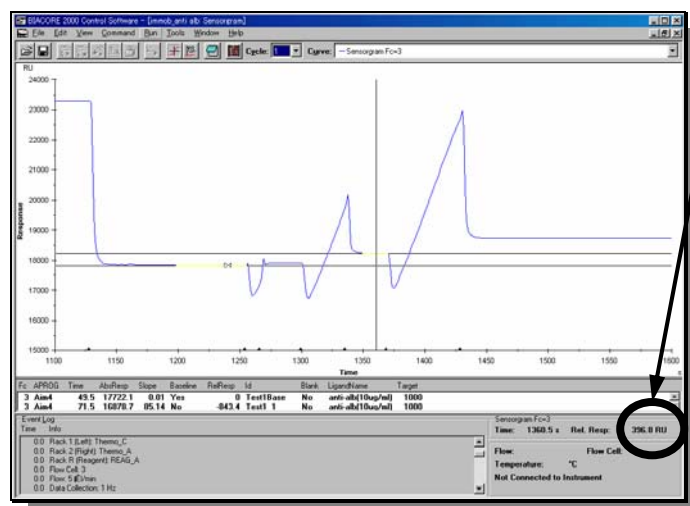
↓

Continue >> をクリックする。

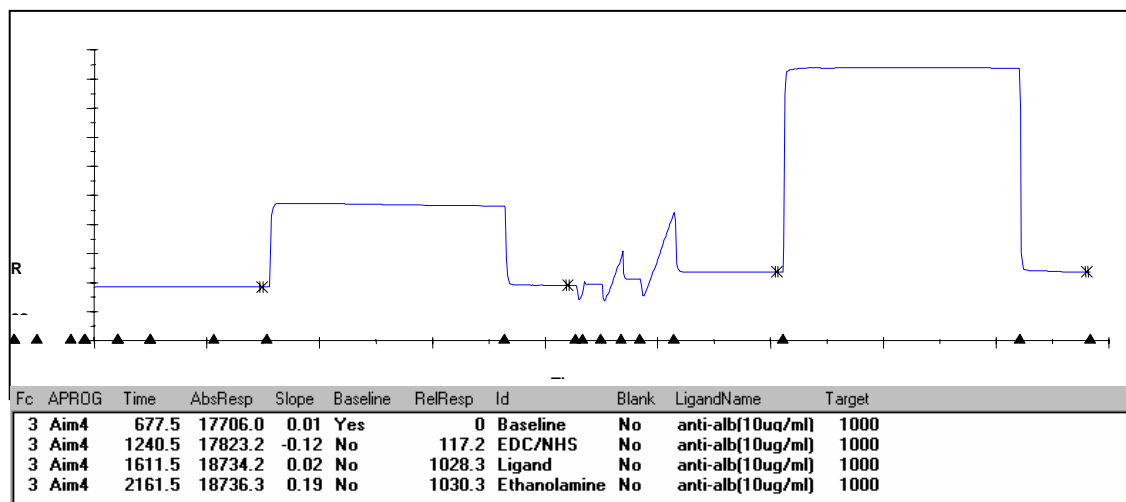
↓

Load Loop...をクリックする。

↓

サンプル位置およびサンプルロード量を入力後、**OK** をクリックする。（最大サンプルロード量は 120µl、消費量はロード量＋30µl。）

↓

Manual を選択し、**Start** をクリックするとリガンドが添加され、**Stop** をクリックすると停止する（この操作を繰り返し、固定化量を調節する）。

（結合量の確認）

アイコン（ ）をクリックし、リファレンスラインを表示させ、リガンド添加前に移動後、**View** → **Baseline** をクリックすると、画面上のレスポンスが 0 になる。さらに、添加後に移動させると、相対的な結合量を表示させることができる。

(3) エタノールアミンによるブロッキング
NHS/EDC 混合液の添加時と同様に、通常の INJECT コマンドを使用し、エタノールアミンを添加する（NHS/EDC と同じ添加時間）。

Fc	APROG	Time	AbsResp	Slope	Baseline	RelResp	Id	Blank	LigandName	Target
3	Aim4	677.5	17706.0	0.01	Yes	0	Baseline	No	anti-alb(10ug/ml)	1000
3	Aim4	1240.5	17823.2	-0.12	No	117.2	EDC/NHS	No	anti-alb(10ug/ml)	1000
3	Aim4	1611.5	18734.2	0.02	No	1028.3	Ligand	No	anti-alb(10ug/ml)	1000
3	Aim4	2161.5	18736.3	0.19	No	1030.3	Ethanolamine	No	anti-alb(10ug/ml)	1000

この方法を用いることで、任意の固定化量に調節できる。
なお、Application Wizard を用いると、簡単に固定化量の調節ができる（95 ページ参照）。

アイコン（ ）もしくは **Run** → **Stop Sensorgram** をクリックし、測定を終了する。

4.相互作用測定

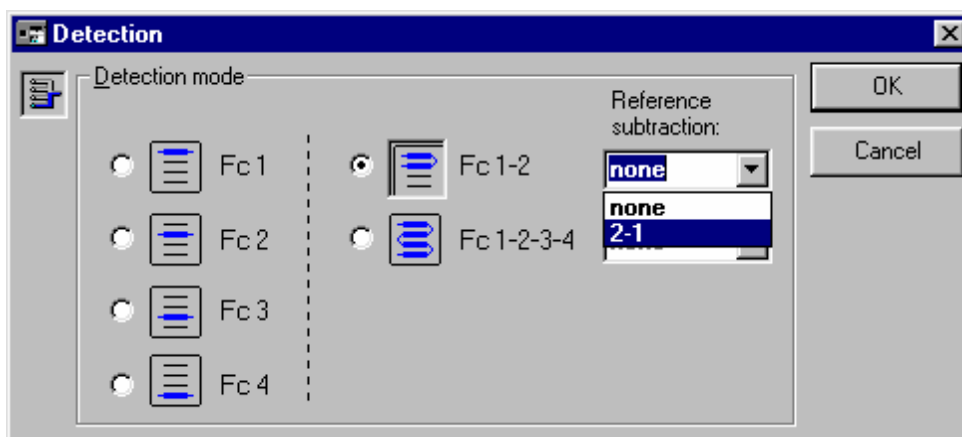
アナライト
リガンドに対して相互作用を測定する分子を「アナライト」という。アナライトとしては、血清や培養上清等のクルード（crude）なサンプルを使用することができるが、不溶性の粒子等は遠心などで除去しなければならない。また、正確な反応速度定数を算出する場合には、精製したものを使用する。
アナライトは、ランニング緩衝液で希釈する。必要のある場合には、ランニング緩衝液でゲルろ過等を使用し、緩衝液交換するか、ランニング緩衝液をアナライト溶解液の組成に合わせる。緩衝液が異なる場合は、結合領域（センサーグラム中のアナライト添加領域）と解離領域（センサーグラム中のアナライト添加終了直後の領域）の間に溶媒効果（Bulk Effect）が発生する（44 ページ参照）。
反応速度定数を算出する場合は、結合領域と解離領域の緩衝液組成が異なる条件化での測定は好ましくない。
アナライト濃度は親和性やアナライトのリガンドとアナライトの分子量にもよるが、およそ数十 ng/ml～数百 μg/ml で行う。反応速度定数を算出する場合には、予想される K_D（解離定数(M)）値の 1/10～10 倍の濃度で分析すると、良好な結果が得られる。また、6 段階以上の濃度系列と濃度 0μg/ml について測定する。さらに、1 濃度については、2 回(n=2)測定する。濃度測定の場合は、検量線作成用濃度既知サンプルについて、6 段階以上の濃度系列と濃度 0 を 2 回以上ずつ（n=2）測定し、定量する濃度未知サンプルも複数回数測定するのが望ましい。

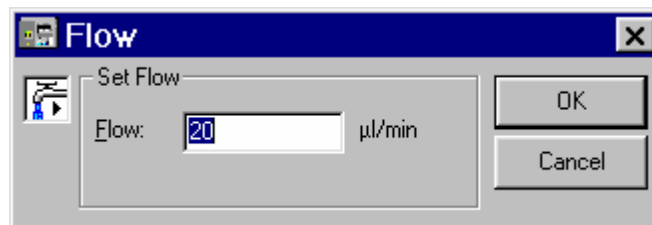
再生溶液
結合したアナライトを強制的に解離させることを再生（Regeneration）という。
理想的な再生は、以下の条件を満たしている。
① リガンドの活性を失わないこと
② リガンドがセンサーチップ表面から遊離しないこと
③ アナライトを完全に解離させること
再生は、再生溶液を添加することにより行う。再生溶液として以下のような種類のものを使用する。（詳しくは 42 ページ参照）
① 高塩濃度溶液
② pH を変化させる溶液（酸性溶液あるいはアルカリ溶液）
③ キレート剤（多価カチオン依存性反応の場合）
④ 界面活性剤
⑤ 有機溶媒
⑥ 変性剤
再生溶液は、30 秒～1 分間添加し、充分再生されない場合には、この短時間の添加を数回繰り返す（長時間の添加は避ける）。

4-1. マニュアル操作による相互作用の検討

サンプルをラックにセットする。

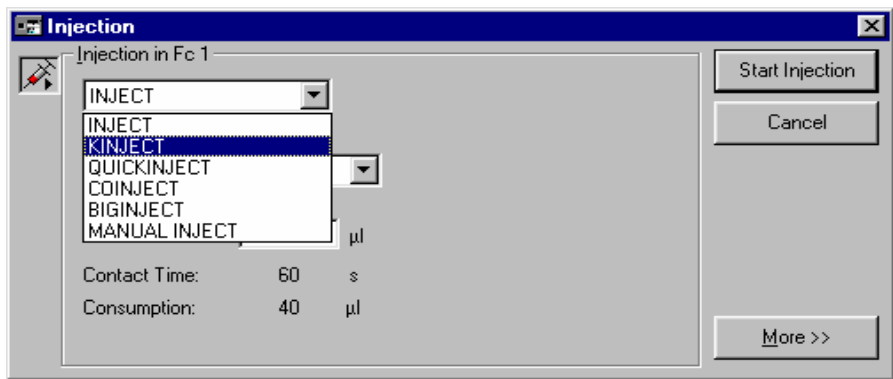
↓

アイコン（ ）あるいは **Run** → **Run sensorgram...**をクリックし、センサーグラムをスタートする。

使用するフローセルの選択およびリファレンス差し引き機能の選択を行い、OK をクリックする。（43 ページ参照）

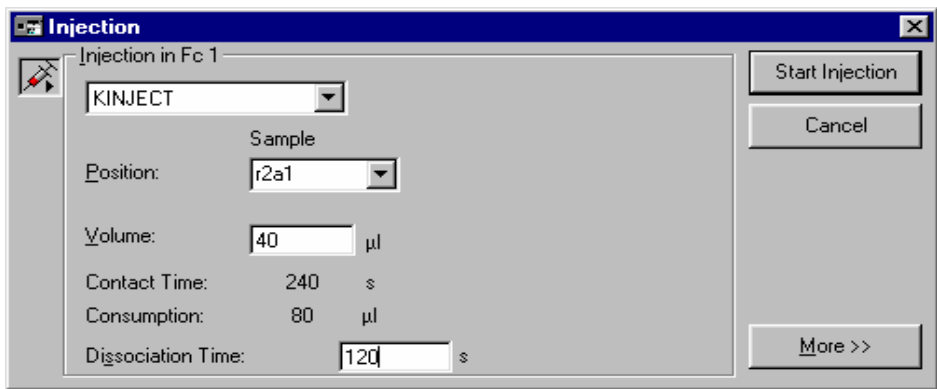
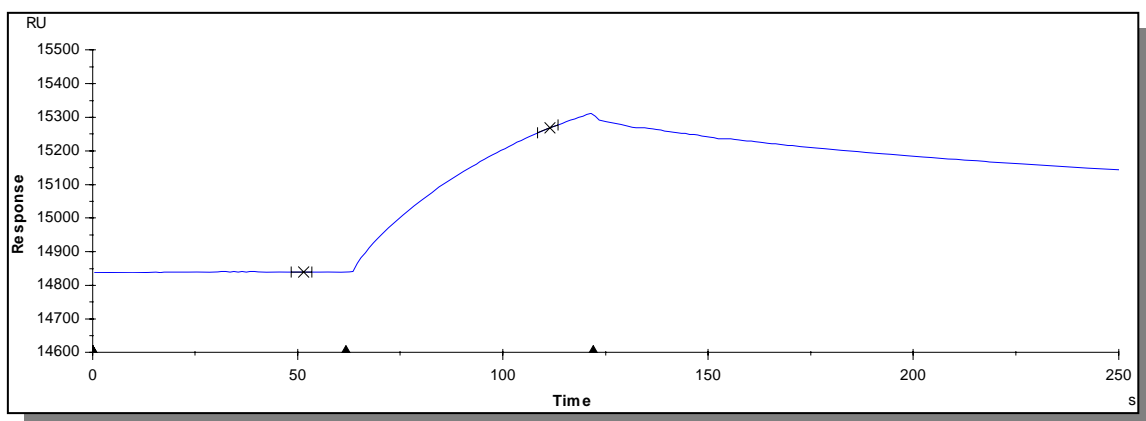
↓

流速を設定し、**OK** をクリックする。

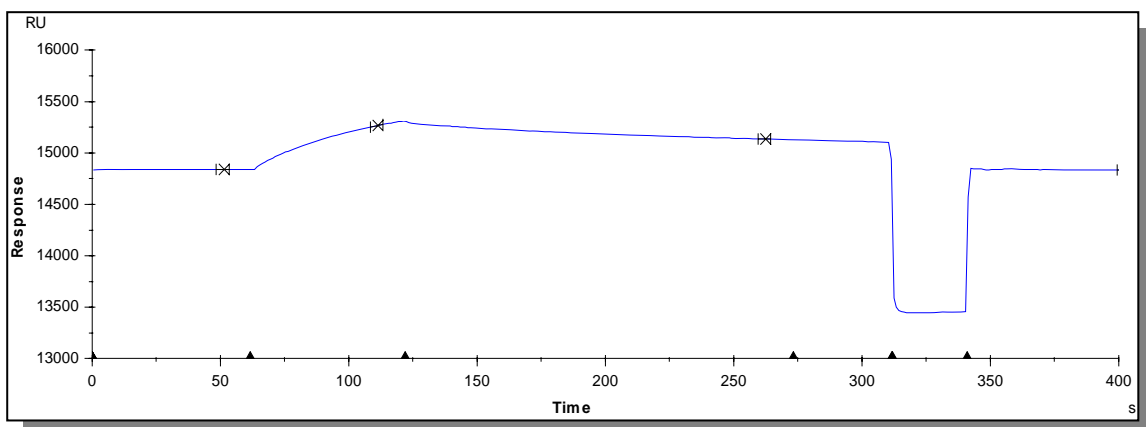
反応速度定数（k_a, k_d）を算出する場合には比較的速い流速に設定する。
20～50µl/min

↓

アイコン（ ）あるいは **Command** → **Inject...**をクリックする。

INJECT の右の▼をクリックすると各種の添加コマンドが表示される(下図参照)。

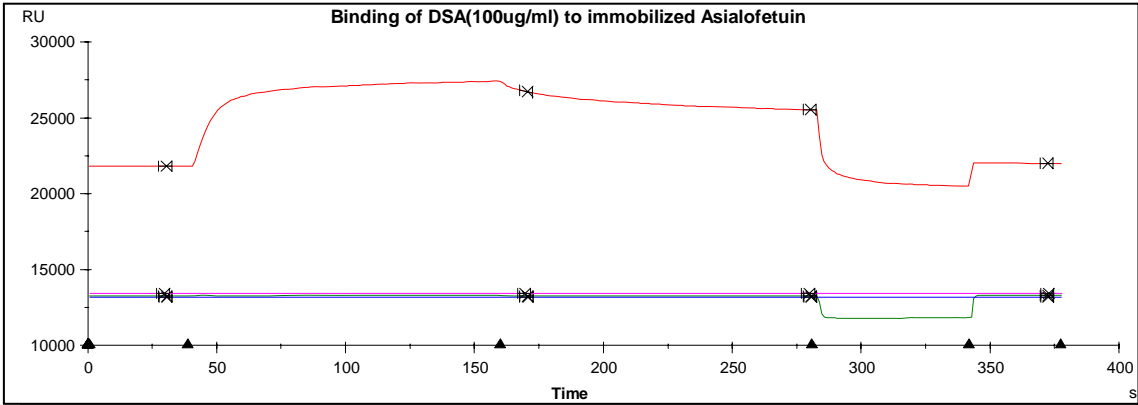
（添加コマンドの種類）

コマンド	内容	試料添加量	試料消費量
INJECT	通常使用のモード	5-325μl	+30μl
KINJECT	反応速度を算出する際に有効 解離時間を入力する	10-250μl	+40μl
QUICKINJECT	試料の必要量が少ない 測定開始までの待ち時間が少ない	5-325μl	+10μl
COINJECT	２つのサンプルを間隔を空けず連続して添加できる Sample 1： Sample 2：	0-100μl 0-100μl	+40μl +40μl
BIGINJECT	大容量の試料を添加する	325-750μl	+52μl
MANUAL　INJECT		32 ページを参照	

添加コマンド、サンプルの位置、容量、その他必要事項を入力し、**Start Injection** をクリックする。

解離状態を観察後、再生溶液（42 ページ参照）を添加し（この場合は INJECT で良い）、結合したアナライトを洗い流す。

↓

さらに分析するサンプルがある場合には、**Run** → **Start New Cycle** をクリックすると同一ファイル内に新しいサイクルとしてセンサーグラムを開始することができる。

測定を終了する場合、アイコン（ ）あるいは **Run** → **Stop Sensorgram** をクリックする。

レポートポイントの取り方については、14 ページを参照すること。
通常は、サンプル添加前 10 秒程度の時間でベースラインをとり、サンプル添加終了 10 秒～30 秒後を結合量として評価する。また、リファレンスセルの差し引きセンサーグラムを表示している場合には、サンプル添加終了直前の値を結合量とする場合もある。

相互作用のセンサーグラム

Fc	APROG	Time	Window	AbsResp	SD	Slope	Baseline	RelResp	Id
1	assay	30.5	5.0	21851.2	0.27	-0.05	Yes	0	Baseline
2	assay	30.6	5.0	13243.6	0.15	-0.07	Yes	0	Baseline
3	assay	30.7	5.0	13193.0	0.14	-0.05	Yes	0	Baseline
4	assay	29.8	5.0	13424.3	0.09	0.02	Yes	0	Baseline
1	assay	170.5	5.0	26755.4	69.27	-36.99	No	4904.2	bound
2	assay	170.6	5.0	13255.5	0.43	0.21	No	11.9	bound
4	assay	169.8	5.0	13422.5	0.20	0.04	No	-1.8	bound

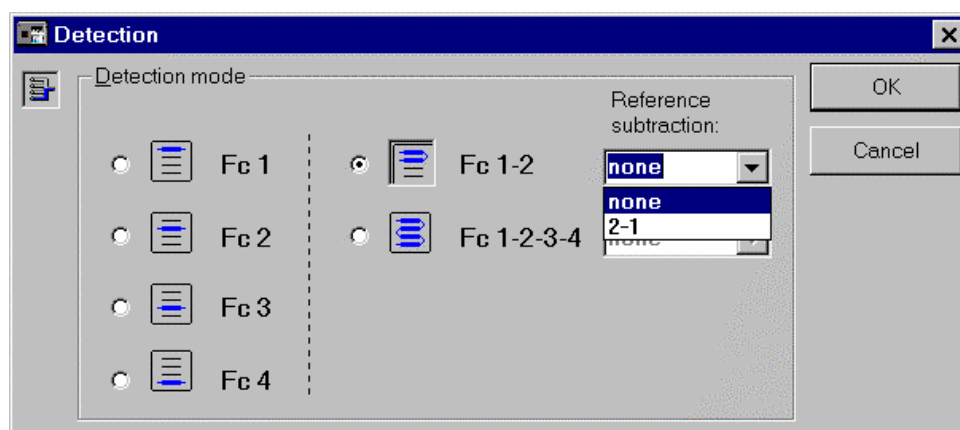
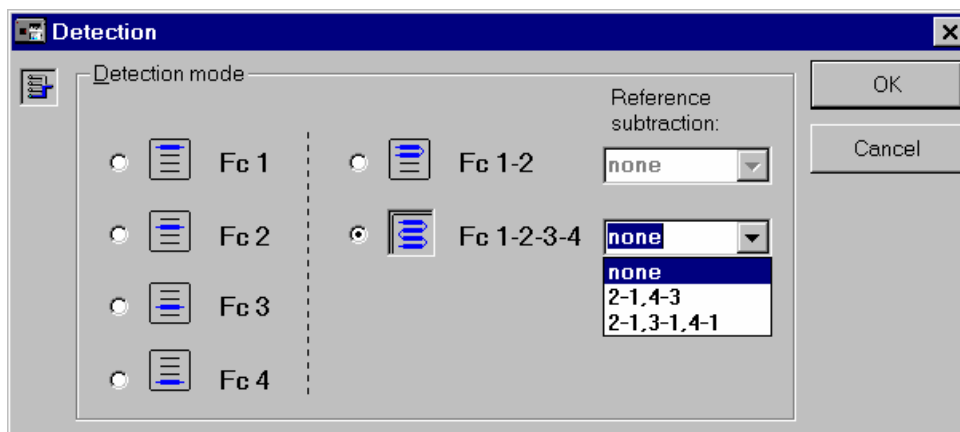
補足 11. 再生溶液の種類

再生溶液は通常以下のようなものが使用される。結合したアナライトが完全に再生され、かつ固定化したリガンドの活性が保持できるものが望ましい。

再生溶液の例

試薬	濃度あるいは pH
（塩）	
NaCl	<1M
（酸性条件）	
10mM Gly-HCl	>pH 1.5
HCl	<100mM
Phosphoric acid	<100mM
Formic acid	< 20%
（アルカリ条件）	
10mM Gly-NaOH	<pH12
NaOH	<100mM
Ethanolamine	<100mM
Ethanolamine-HCl	<1M
（キレート剤）－多価カチオン依存性反応の場合	
EDTA	<0.35M
（界面活性剤）	
Surfactant P-20 (Tween 20)	<5%
Triton X-100	<5%
SDS	<0.5%
Octylglucoside	<40mM
（有機溶媒）	
Acetonitrile	<20%
DMSO	<8%
Ethyleneglycol in HBS buffer	<50%
Ethanol	<20%
Formamide	<40%
（変性剤）	
Guanidine-HCl	<5M
Urea	<8M

補足 12. 流路の選択

実験の目的によって、サンプル、再生溶液を流す流路を選択できる。
リファレンスセルにも同時にアナライトを添加する場合には、複数のセルを選択後、リファレンスサブトラクションを利用すると、リファレンスセルのレスポンスを差し引いたセンサーグラムを表示することができる。
この場合、リファレンスセルとできるのは、フローセル 1 と 3 である。

上図の場合、フローセル 1 をリファレンスにして、フローセル 2 のセンサーグラムからフローセル 1 のセンサーグラムを差し引きしたグラフを表示することができる。また、Fc1-2-3-4 を選択すると、以下のボックスの各種差し引きセンサーグラムを表示することができる。

補足 13. センサーグラムの表示

画面に表示するセンサーグラムを変更することができる。

① 1 本表示

View → **Plot Single** をクリックすると、選択したセンサーグラム 1 本を表示する。

左上の **Curve**: Sensorgram Fc=1 の▼をクリックし、表示センサーグラムを選択する。

② 複数表示

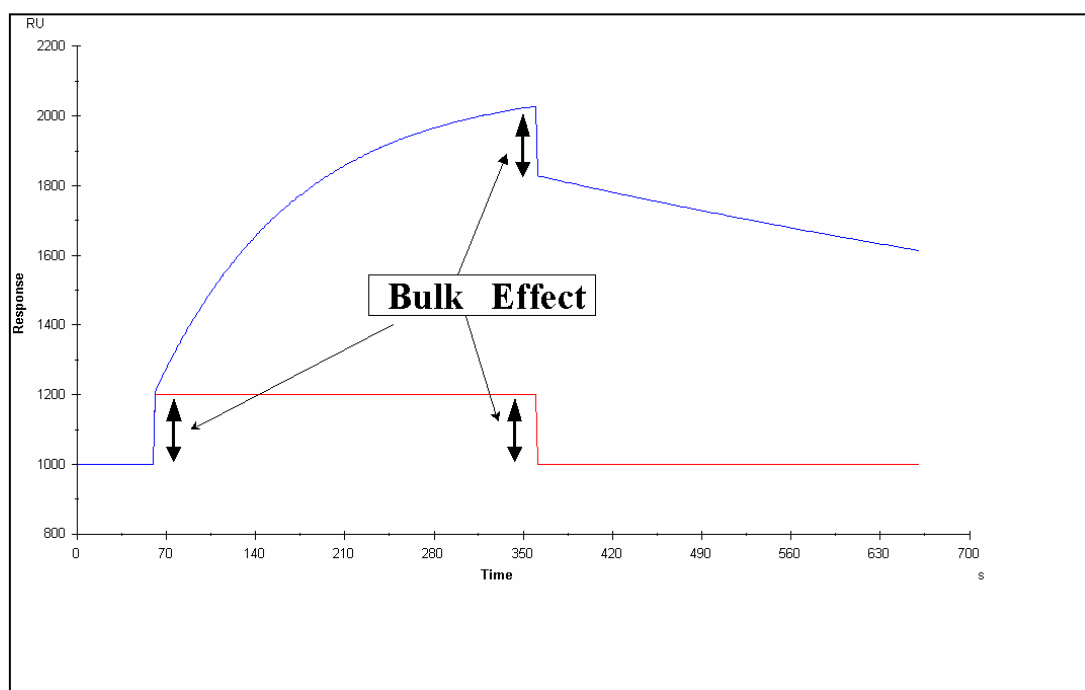
View → **Plot Overlay** をクリックすると、すべてのセンサーグラムを表示することができる。

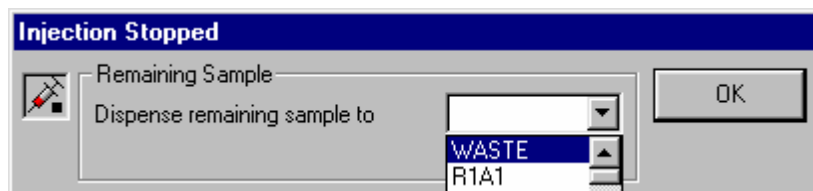
③ カーブの種類別表示

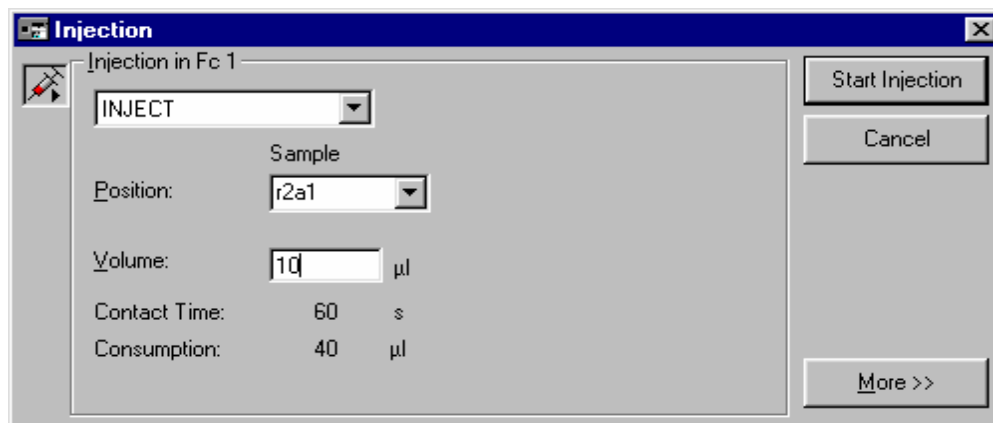
表示センサーグラムの種類が多い場合には、センサーグラムの種別で表示変更することができる。

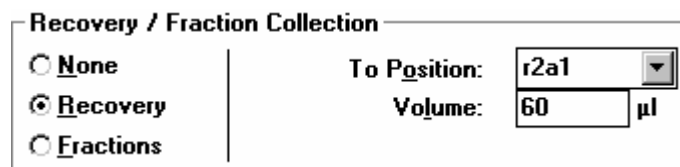
View → **Plot Curve Classes** をクリックし、Curves:を選択することで、各フローセルのセンサーグラムもしくは差し引きセンサーグラムのいづれかを選択して表示することができる。

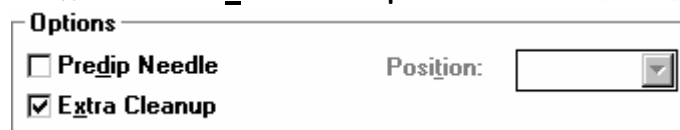
補足 14. Bulk Effect

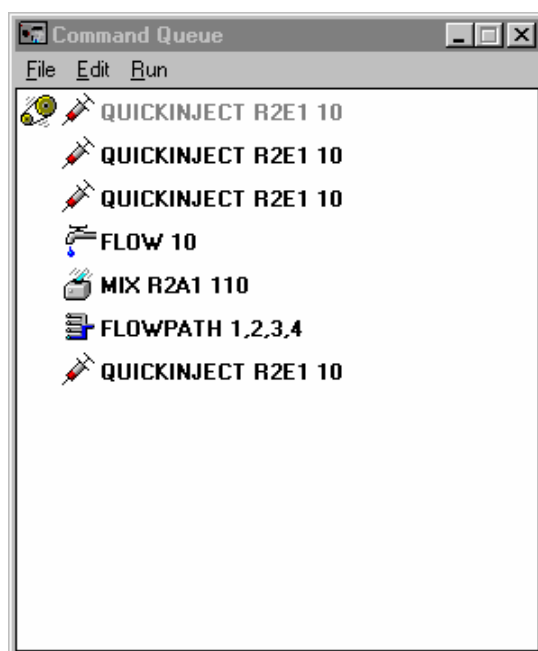
アナライトは、できるだけランニング緩衝液で希釈する。アナライト溶解液とランニング緩衝液の組成が異なる場合には、溶液効果(Bulk Effect)が大きくなる。

補足 15. 添加の中止

添加を途中で中止したい場合には、添加開始後、アイコン（）もしくは **Command** → **Stop Inject** をクリックする。ニードルに残ったサンプルを設定したラック上の位置（あるいは WASTE）に戻すことができる。

補足 16. 添加コマンドの拡張機能

添加コマンドには以下のような拡張機能がある。

① 試料の回収

試料の回収を行う場合には、**More>>**をクリック後、**Recovery** をマークして、回収先であるラック上の位置と回収量を入力する。

② **Extra Cleanup**

クルードなサンプル等を使用し、添加後のニードル、流路などの洗浄を通常よりも念入りに行う場合には、**Extra Cleanup** にマークを入れる。

補足 17. Command Queue

マニュアル操作でセンサーグラムを開始すると **Command Queue** ボックスのアイコンがセンサーグラム画面右上に表示される。このボックスをクリックして開くと、マニュアル操作で入力したコマンドを確認することができる。入力したコマンドは入力順に実行していく。また、入力したコマンドの 1 つを削除する場合には **Edit → Delete**、コマンド間にコマンドを挿入する場合には **Edit → Insert** をクリックし、新たにコマンドを入力する。

Command Queue ボックスは右上の縮小ボタンをクリックしてアイコン化(縮小)することができる。また、アイコンをクリックすると再びボックスを開くことができる。

4-2. プログラム操作による相互作用測定

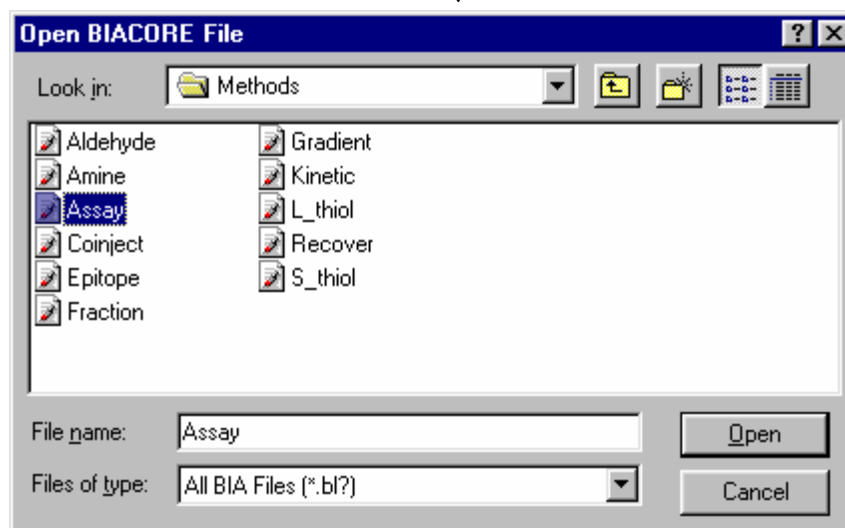
固定化と同様に基本となるプログラムファイルを呼び出し、修正後実行する。ここでは相互作用検討用のプログラムファイルである Assay.blm を基本に説明する。プログラムの詳細については、61 ページを参照すること。

Application Wizard を用いると簡単に相互作用の実験を行うことができる。

1. スクリーニング　116 ページ参照
2. 解離定数・反応速度定数の算出　122 ページ参照

4-2-1. ファイルの呼び出し

アイコン（　）あるいは **File** → **Open…**をクリックする。

↓

C：＼Program Files＼BIACORE 2000＼guide＼Methods とフォルダーを開け、相互作用測定用のプログラムファイルである **Assay.blm** を選択後、**Open** をクリックする。

```
DEFINE APROG assay
PARAM %pos %ID %conc
CAPTION Binding of %ID(%conc) to immobilized antibody

        FLOW        20
        FLOWPATH    1,2
   *    KINJECT     %pos 40 120
-0:10   RPOINT      baseline -b
 2:10   RPOINT      bound
   *    INJECT      R2F3 20
 2:00   RPOINT      regeneration
END

MAIN
        RACK        1           thermo_b
        RACK        2           thermo_a
        DETECTION   2-1
        APROG       assay       R2A1 Antigen       25ug/ml
        APROG       assay       R2A2 Antigen     12.5ug/ml
        APROG       assay       R2A3 Antigen     6.25ug/ml
        APROG       assay       R2A4 Antigen    3.125ug/ml
        APPEND      standby
END
```

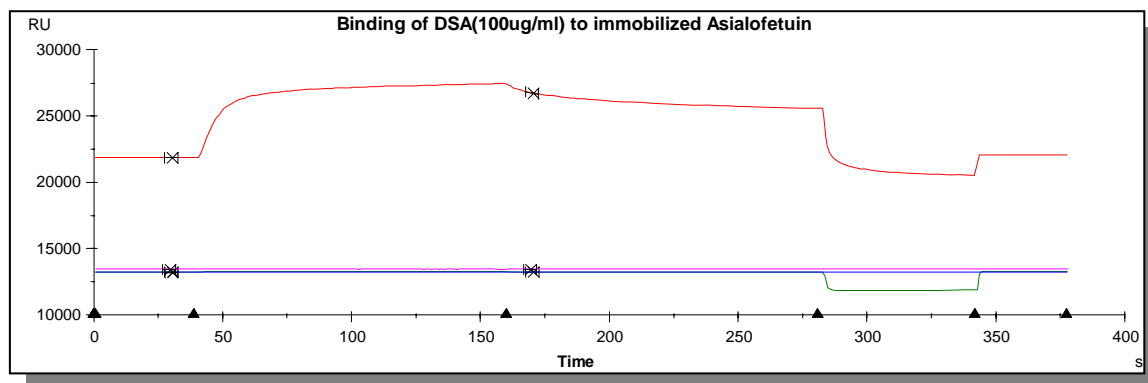
このプログラムでは、フローセル２に固定化したリガンドに対し、アナライトとの相互作用を測定するプログラムを表示している（フローセル１はリファレンスセル）。
DETECTION の設定は、下記の中から選択する。

DETECTION の設定

（シングル検出）	（マルチ検出）	（差し引き機能）
DETECTION 1	DETECTION 1,2	DETECTION 2-1
DETECTION 2	DETECTION 1,2,3,	DETECTION 2-1,4-3
DETECTION 3		DETECTION 2-1,3-1,4-1
DETECTION 4		

4-2-2. プログラムの編集
固定化操作の項（26 ページ）を参照すること。

4-2-3. エラーの検索
固定化操作の項（27 ページ）を参照すること。

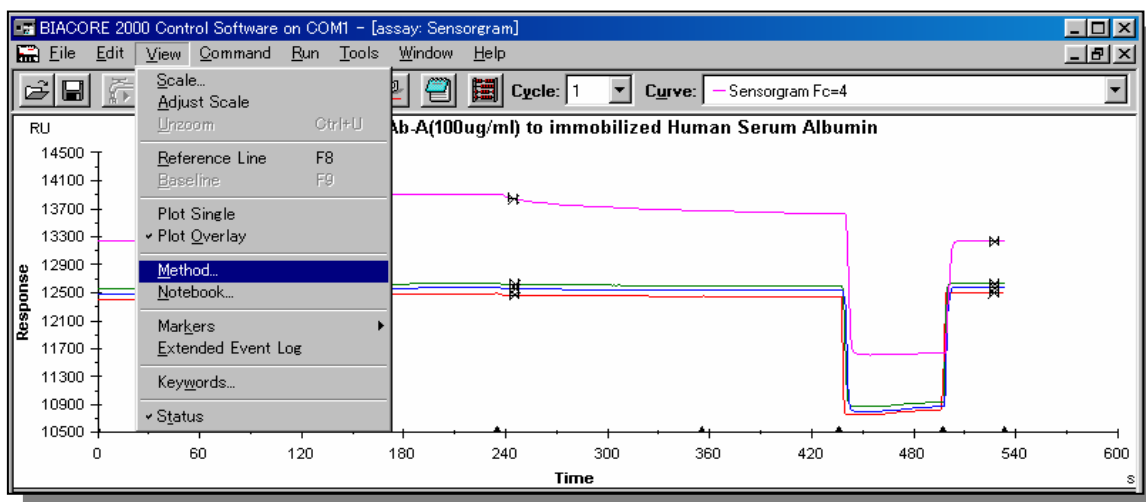
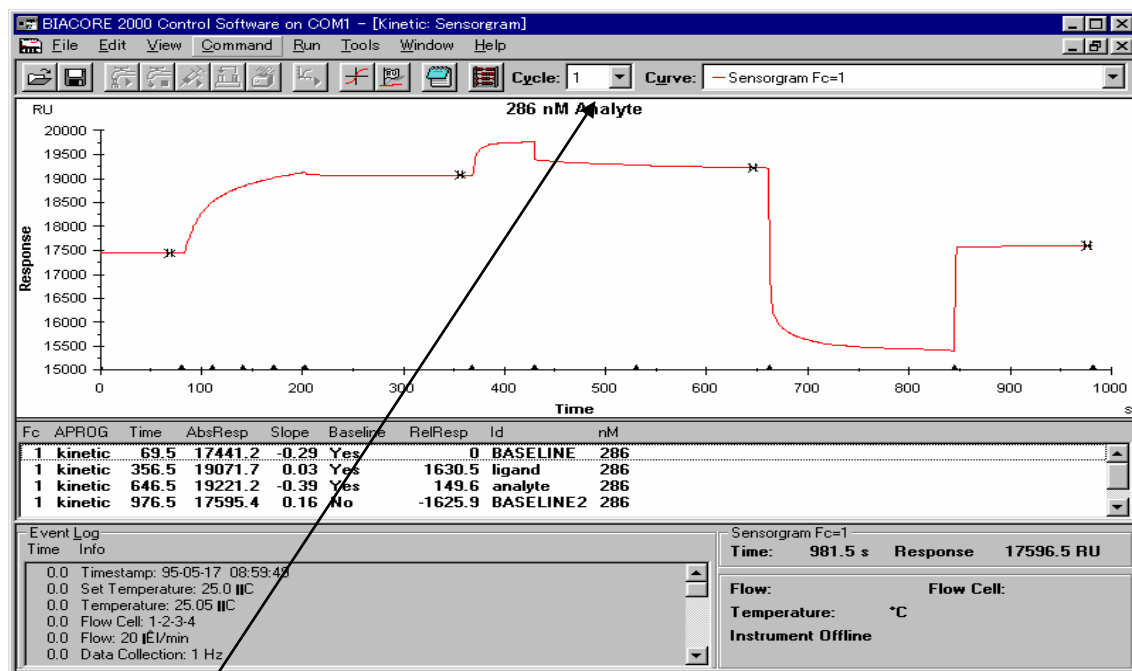
4-2-4. プログラムの実行
固定化操作の項（28 ページ）を参照すること。

4-2-5. プログラムの終了
固定化操作の項（30 ページ）を参照すること。

（重要）
実行後にプログラムを強制終了したい場合には、キーボードの

Ctrl（左下）＋Break（右上）

を同時に押し、緊急停止する。

補足 18. プログラムの実行における注意事項・解説

① プログラムファイルはリザルトファイル中に保存される。リザルトファイル上で **View** → **Method...**をクリックすれば、センサーグラム作成時のプログラムが表示される。また、改めてそのプログラムを実行することができる。

② データは 1 サンプルごと 1 つのセンサーグラム（サイクル）として保存される。

Cycle [1 ▼] のサイクル番号を選択すると、他のサンプルのセンサーグラムを表示することができる。１つのファイルの中に測定サンプル数のサイクルが存在することになる。

5.シャットダウン

5-1. 実験の終了

測定が終了した場合には、次の 2 つの方法のどちらかを行う。
① Standby 状態での放置
② 電源を落として終了
引き続き、3 日以内に同様のセンサーチップで実験を行う場合には、①の **Standby** 状態で放置する。3 日以上使用しない場合には、②の電源を落として終了を行う。

① **Standby** の実行
Tools → Working Tools... をクリックし、**Standby** を選択し、実行する。
5 µl/min の流速で最大 96 時間、ランニング緩衝液を送り続ける操作である。週末に使用しないような場合、Standby を実行する。96 時間の Standby でランニング緩衝液の消費量はおよそ 80 ml 程度である。

② 電源を落として終了
電源を落とす場合には、システムを MilliQ®水で置換して、Biacore の流路中の緩衝液を完全に除く（洗浄には洗浄用センサーチップを使用）。流路系等に塩の析出を防ぐために行うものである。これには、2 つのステップがある。
・**MilliQ®**水で **Prime**
ランニング緩衝液ボトルを MilliQ®水ボトルに置き換え、**Tools → Working Tools...**をクリックし、**Prime** を実行する。
・引き続き **Close**
16mm ガラスバイヤルに MilliQ®水を 3 ml 入れ、 **R2F3** におき、**Tools → Working Tools...**をクリックし、**Close** を実行する。

5-2. センサーチップの取り出し（Undock）

Command → **Undock...**をクリックし、**Undock** を実行する。

↓

フロントパネルの Sensorchip の緑のライトが点灯から点滅に変わったら、
センサーチップを抜きとる。

↓

Biacore システム、コンピューター、モニター、プリンターの電源を落とす。

↓

ランニング緩衝液、廃液入れをかたづける。

5-3. センサーチップの保存

実験使用後抜き取ったセンサーチップは、以下の方法で保存することができる。

① Dry 状態での保存
取り出したセンサーチップを 50 ml 容のふた付きプラスチック管等に入れるか、もしくはパラフィルムで多い、4℃で保存する。安定なタンパク質やペプチド、DNA を固定したセンサーチップの保存に用いる。

② Wet 状態での保存
取り出したセンサーチップのシート部分をカバーから抜き取り、シートだけを緩衝液を入れた容器（50 ml 容のふた付きプラスチック管等）に入れ、4 ℃で保存する。センサーチップを再利用する時には、シートについた緩衝液を拭き取った後、カバーに戻し使用する。リガンドの固定している側は、細くとがらせたキムワイプ等を四角の隅にあて、余分な緩衝液を吸い取る。リガンドの固定していない側は反射面となるので、キムワイプ等で全体をきれいにふきとる。特に反射面には濁りや汚れ等がないように注意する。金膜部分以外の白い部分は、キムワイプ等でしっかり拭き取る。

サンプルの種類によっては、どちらの方法を用いても、保存中に変性する場合があるので、再 Dock 後、ポジティブコントロールサンプルで活性を確認すること。

6.メンテナンス

6-1. メンテナンス

Biacore のメンテナンスは、**Working Tools**（Tools → Working Tools…）中のコマンドを用いて行う。

実験を行う前後に

Prime

新しいセンサーチップを Dock した時やランニング緩衝液を交換する時に行う操作である。ポンプや IFC（マイクロ流路系）、オートサンプラー等をランニング緩衝液（前）または MilliQ®水（後）で置換洗浄する。（所要時間約 6 分 30 秒間）

☆ 大きく塩濃度が変化する緩衝液や粘性の異なる緩衝液に交換する場合には、Prime を 2～3 回繰り返すことをお奨めする。

実験途中にランニング緩衝液で洗浄したい場合に

Flush

IFC とフローセルをランニング緩衝液で簡単に洗浄する。（所要時間約 3 分間）

Rinse

IFC、フローセル、回収カップをランニング緩衝液で高流速で洗浄する。（所要時間約 8 分間）

定期的な洗浄

Desorb（毎週 1 回が目安）

IFC やフローセル等に付着したタンパク質や脂質を洗浄する操作である。
BIA メンテナンスキット中の **BIAdesorb solution 1**（**0.5 % SDS** 溶液）および **BIAdesorb solution 2**（**50 mM Gly-NaOH**、**pH 9.5**）を使用する。

Thermo_A をラックベース 2（右側）に使用し、ランニング緩衝液の位置には **MilliQ®**水をセットする。R2F3 に 3ml の BIAdesorb solution 1 を、R2F4 に 3 ml の BIAdesorb solution 2 をセットして行う。（所要時間約 22 分間）

☆ Biacore のメンテナンスにおいて Desorb は非常に重要である。
☆ BIAdesorb solution 1 は 4℃で保存すると結晶が析出するので、室温におくこと。
☆ センサーチップに固定してあるリガンドは失活するので、必ず洗浄用のセンサーチップと入れ替えて行う。
☆ 設定温度を 20℃以下で行わない。
☆ Sanitize 終了後、MilliQ®水あるいはランニング緩衝液で Prime を 1～2 回行う。

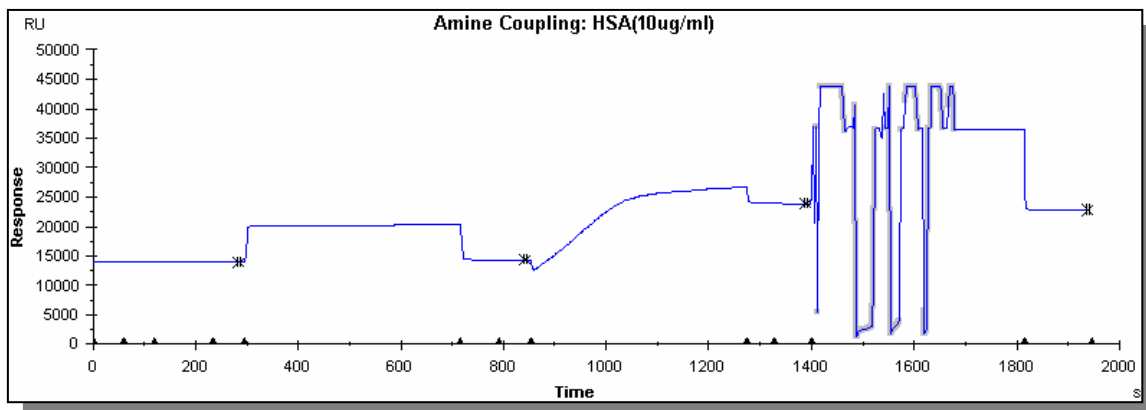
Sanitize（毎月 1 回が目安）

IFC やフローセルを殺菌する操作である。病原性があるサンプル等を使用したときには、適時 Sanitize を実行する。**BIAdisinfectant solution**（次亜塩素酸ナトリウム溶液）と **MilliQ®**水を使用する。

ステップ 1：1.5 ml の BIAdisinfectant solution を BIA メンテナンスキット内の専用の容器に入れ、20 ml の水で希釈し、ランニング緩衝液の位置に置き実行する。
ステップ 2：MilliQ®水 15 ml をランニング緩衝液の位置に置き実行する。

☆ センサーチップに固定しているリガンドは失活するので、必ず洗浄用のセンサーチップと入れ替えて行う。
☆ Sanitize 終了後、MilliQ®水あるいはランニング緩衝液で Prime を 1～2 回行う。

6-2. エアーが混入したときの対処法

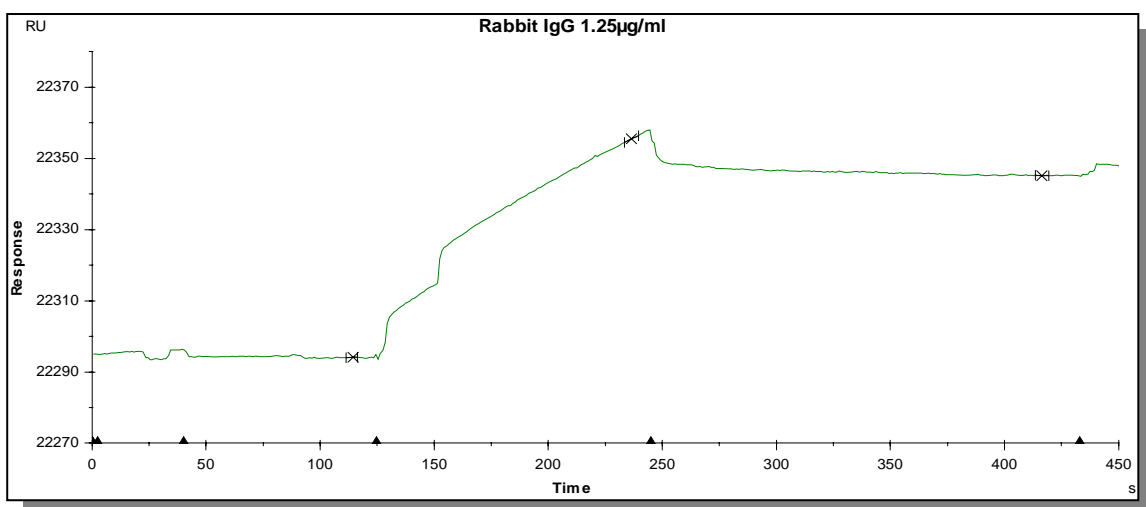
脱気していない緩衝液を使用したり、エアーを添加すると、エアーが流路系内に留まってしまうことがある。

このような場合には、以下の操作を順次行い、エアーの除去を行う。

① **Tools** → **Working Tools...** → **Prime**、**Flush**、あるいは **Rinse** を組み合わせて数回行う。

② **Tools** → **Service Tools...** → **Unclogging** を行う。

上記のような乱れが解決しない場合には、IFC（マイクロ流路系）の劣化の可能性が考えられるので、システムチェックを行って機械の状態を確認する（56 ページ参照）。

6-3. 流路系に詰まりがあるときの対処法

不溶性のサンプルや吸着性の高いサンプルを使用することで、流路が詰まる場合がある。このような場合、センサーグラム（特に試料添加中）に乱れが発生する。

ランニング緩衝液を高流速で流し、詰まりを除去する。

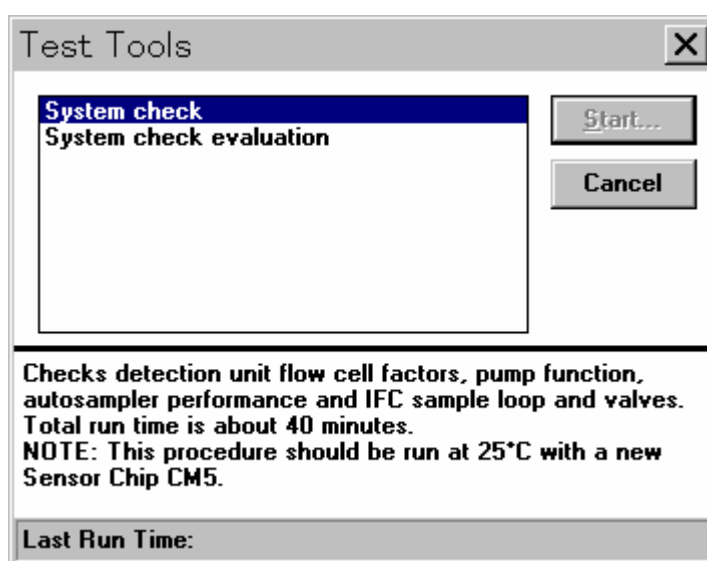
Tools → **Service Tools...** → **Unclogging** を行う。

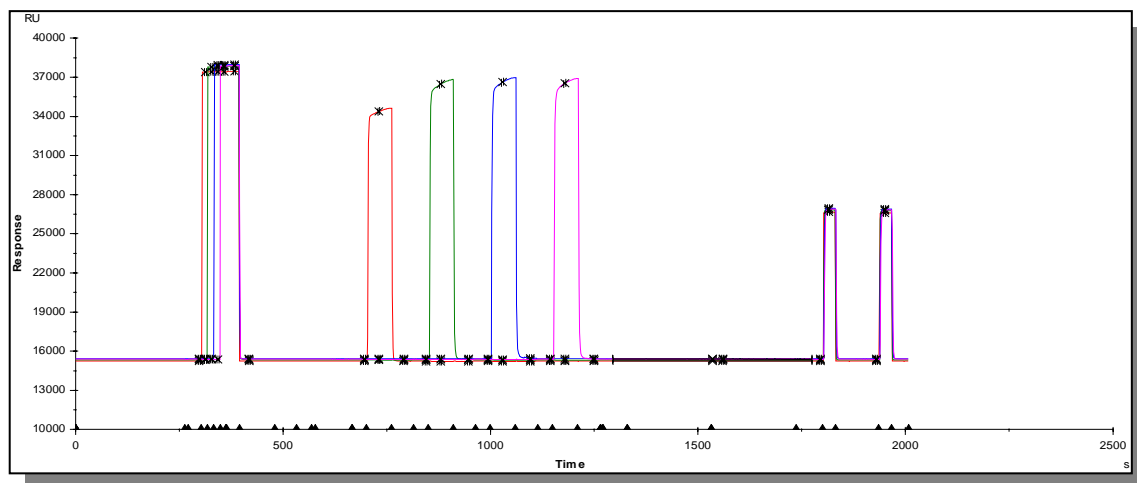
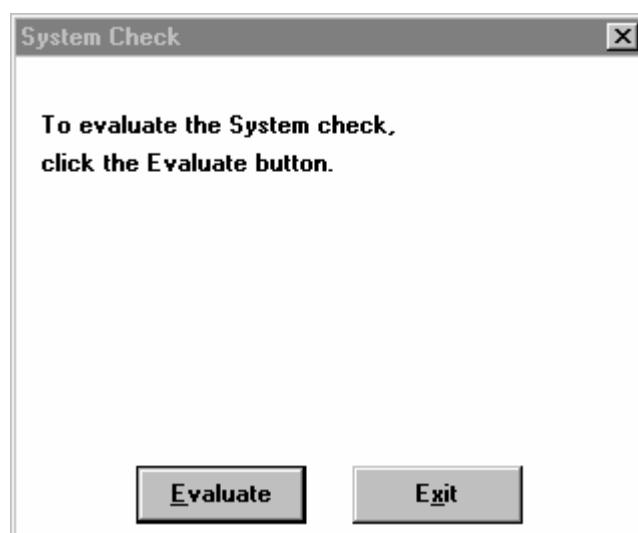
6-4. システムチェック

ベースラインがドリフトするなど機械の調子が思わしくない場合には、以下の方法でシステムチェックを行う。定期的に実施することをお奨めする。

使用するもの
① 新しいセンサーチップ **CM5(**すでに固定化をおこなっているチップは使用できない**)**
② **HBS-EP** 緩衝液
③ **9mm** ガラスバイヤル
④ **BIAtest solution (BIA maintenance kit)**

（方法）
Desorb,　Sanitize 終了後、新しいセンサーチップを Dock し、HBS-EP 緩衝液で Prime を実施する。

ラックベース 2 に Thermo_A を使用し、**BIA maintenance kit** 中の **BIAtest solution** 1 ml を 9 mm のガラスバイヤルに入れ、R2F1 にセットする。
↓
9mm の空のガラスバイヤル 4 本を R2E1 から R2E4 にセットする。
↓
Tools → **Test tools** → **System check** をクリックする。
（所要時間：約 40 分）

Start...をクリックする。

（結果の表示）

（システムの評価）

約 40 分間の測定終了後、上記のようなボックスが表示される。

↓

Evaluate をクリックする。

BIACORE 2000 System Check

Name: ____________________

Created By:	BIACORE 2000 Control Software	**Version:**	3.0.7 Beta
Instrument id:	2076	**Configuration:**	IFC3 with Recovery
Run Date:	22-Mar-1999	**Evaluation Date:**	02-Sep-1999
Analysis temp:	25.0 °C		

RESULTS

A. IFC

	Serial		Sequential		Clip	
Fc 1:	22165	OK	19141	OK	16	OK
Fc 2:	22469	OK	21141	OK	17	OK
Fc 3:	22501	OK	21193	OK	26	OK
Fc 4:	22461	OK	21159	OK	20	OK
Fc 1-2-3-4:	22439	OK			25	OK
Leaks:	-34	OK				

B. Refractometer test

15% Sucrose			Baseline level		
Fc 1:	22209		**Fc 1:**	15246	
Fc 2:	22510		**Fc 2:**	15334	
Fc 3:	22538		**Fc 3:**	15435	
Fc 4:	22499		**Fc 4:**	15390	
Average:	22439	**(22000 - 23000)**	**Average:**	15351	
Stdev:	154	**(< 200)**	**Stdev:**	82	**(< 300)**

C. Mixing

Mix 1:	11496	
Mix 2:	11432	
Average:	11464	
Difference (%):	0.6	OK
Dilution factor:	-0.02	OK

D. Noise

Short term	Stdev		Long term	Slope	
Fc 1:	0.21	**(< 0.3 RU)**	**Fc 1:**	0.01	**(< 0.05 RU/s)**
Fc 2:	0.20	**(< 0.3 RU)**	**Fc 2:**	0.01	**(< 0.05 RU/s)**
Fc 3:	0.12	**(< 0.3 RU)**	**Fc 3:**	0.00	**(< 0.05 RU/s)**

診断結果が表示される。

問題がある場合には赤色表示、もしくは **error** マークが表示される。次ページの解説にしたがって対処する。それでもシステムの調子が思わしくない場合には、機械の故障が考えられる。

7.データ管理

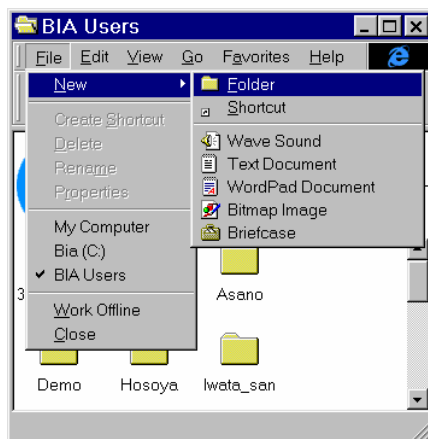
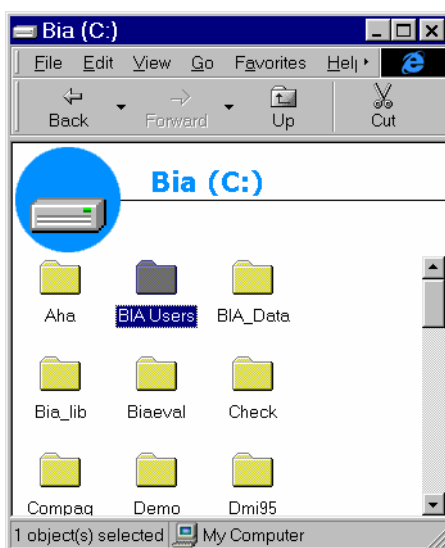
実験結果ファイルは各自のフォルダー内に保存する。各自のフォルダーは以下の方法で **Bia Users** フォルダーの中に作成する。

① **My Computer** から作成する方法

Windows 初期画面の **My computer** （My Computer） をクリックする。

↓

Bia(C)：をクリックし、**Bia Users** のフォルダーをダブルクリックして開く。

↓

File → **New** → **Folder** をクリックし、フォルダー名入力後、**Enter** をクリックする。

② **Explore** から作成する方法

Start → **Program** → **Windows Explores** をクリックする。

↓

C：（ハードディスク）の中の **Bia Users** のフォルダーをハイライトにし、**File** → **New** → **Folder** をクリックする。

↓

フォルダー名を入力し、**Enter** をクリックする。

補足 19. フォルダー作成における注意事項・解説

自分のフォルダーは **Bia Users** の中に作成する。他のフォルダー内に作成すると（例えば Biacore 等）、ソフトウェアの再インストール時に、消去されてしまう場合がある。

各自のフォルダーの中に、さらに詳細なフォルダーを作成することも可能である。日付あるいは実験内容別に、細かくフォルダーを分類すると便利である。

補足 20. ファイルの容量について

基本的な実験での各ファイルの容量はおおよそ以下のようになる。

① 固定化

（アミンカップリング）

1 個のフローセルを使用した場合	約 20 kb
4 個のフローセルを使用した場合	約 76 kb

（チオールカップリング）

1 個のフローセルを使用した場合	約 20 kb

② 相互作用

1 個のフローセル使用、5 サンプルの場合	約 90 kb
5 個のフローセル使用、5 サンプルの場合	約 150 kb

8.プログラムの説明

ここでは、プログラムを基礎から理解することを目的としている。

Biacore のプログラムは基本的に 1 つの **MAIN** ブロックと 1 つあるいは複数の **DEFINE APROG** ブロックから成り立っている。MAIN ブロックでは、プログラム全体の諸条件を設定し、DEFINE APROG ブロックで実験操作の詳細を設定する。どちらのブロックも最後の行に END を入力してブロックを括る。

ステップ 1：　MAIN　ブロックの作成

1 つのプログラムには必ず 1 つだけの MAIN ブロックが存在する。MAIN ブロックの内容は、上のコマンドから順次実行する。プログラムは MAIN ブロックだけで動かすことができる。非常に簡単な MAIN ブロックのみのプログラムを示すと次のようになる。

File → **New Method** をクリックし、プログラムを入力する。

```
MAIN
        DETECTION 1
END
```

Run → **Run Method...** をクリックすると、プログラムを実行する。モニター画面の右下、 status　window の DETECTION が 1 に設定されすぐにプログラムが終了する。

次に、この MAIN ブロックを少しだけ複雑にする。以下のプログラムを入力する。

同様に Run（**Run** → **Run Method...**）させる。

```
MAIN
        DETECTION 1
        DETECTION 2
        DETECTION 3
        DETECTION 4
END
```

DETECTION 1 → 2 → 3 → 4 と切り替わり終了する。

このように、**MAIN** ブロックはコマンドを上から順番に実行していく。

（参考）
MAIN ブロックだけを使用し、便利な洗浄プログラムを組むことができる。プログラムで Working Tools 中のメンテナンスコマンドを実行することができる。

```
MAIN
          Prime
          Prime
          Rinse
          Rinse
END
```

上記のように入力後、Run させると、Prime を 2 回、Rinse を 2 回実行して終了する。しばらく Biacore を洗浄したいときに便利である。

プログラム中に **MAIN** ブロックが 1 個あれば、プログラムは実行できる。逆に、**MAIN** ブロックがないとプログラムを実行することはできない。

ステップ 2：　**DEFINE APROG** ブロックの作成
プログラムは MAIN ブロックがあれば Run させることができるが、MAIN ブロックだけではサンプルの添加等の細かい実験操作を実行することはできない。**DEFINE APROG**（Analysis Program の略）ブロックを使用してこれらの操作を行う。

ここでは、サンプルを 1 回添加するプログラムを作成する。ラック 2 の R2A1 にサンプルをセットし、このサンプルを 1 分間添加するプログラムを作成する。

```
DEFINE   APROG   injection
     FLOW          5
     INJECT        R2A1   5
END
```

FLOW は流速の設定で、この場合 5 µl/min になる。
DEFINE APROG injection の **injection** とは、この DEFINE APROG ブロックの名前（プログラム名）である。
Run → **Prerun　Method** を行うと以下のような**"error"**が表示される。（Prerun Method は、作成したプログラム言語が正しいかどうか検索するものである。27 ページ参照）

```
>> Expecting keyword MAIN
```

これは、MAIN ブロックがないというメッセージである。

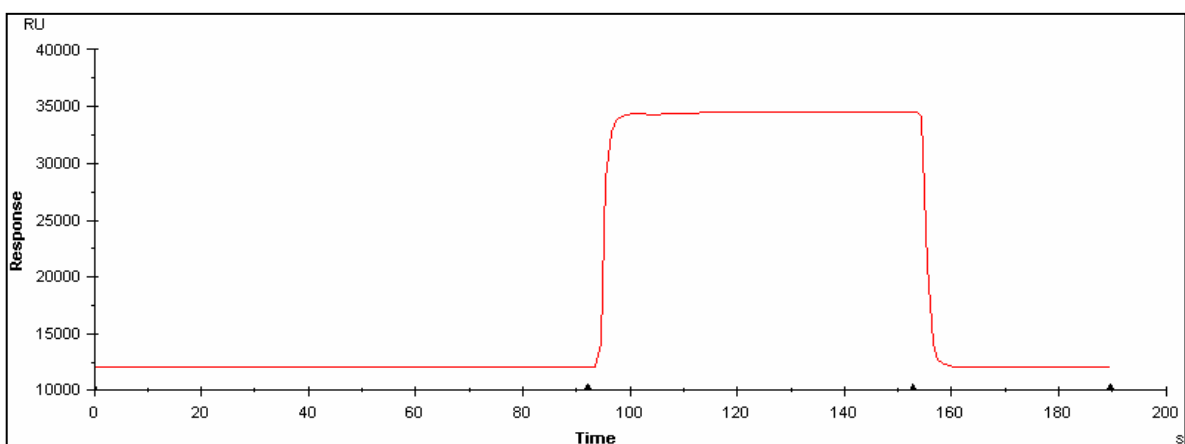
> プログラムは **DEFINE APROG** ブロックだけで実行することはできない。

次のプログラムのように MAIN ブロックを使用して DEFINE APROG ブロックを行う命令を入力する。

```
DEFINE   APROG   injection
         FLOW     5
         INJECT   R2A1   5
END

MAIN
         DETECTION          1
         APROG              injection
END
```

まず MAIN ブロックを上から順に実行し、APROG injection で上記の DEFINE APROG　injection が実行される。DEFINE APROG ブロックが終了すると MAIN ブロックの END となりプログラムが終了する。

> **DEFINE　APROG**（名前）と **MAIN** ブロックの **APROG**　（名前）の名前が一致していないとプログラムは実行されない。

APROG を数回繰り返し実行する場合には、MAIN ブロックの APROG injection を繰り返す回数分入力する。以下の場合には APROG を 2 回繰り返して実行する。

```
DEFINE  APROG  injection
        FLOW          5
        INJECT        R2A1 5
END

MAIN
        DETECTION     1
        APROG         injection
        APROG         injection
END
```

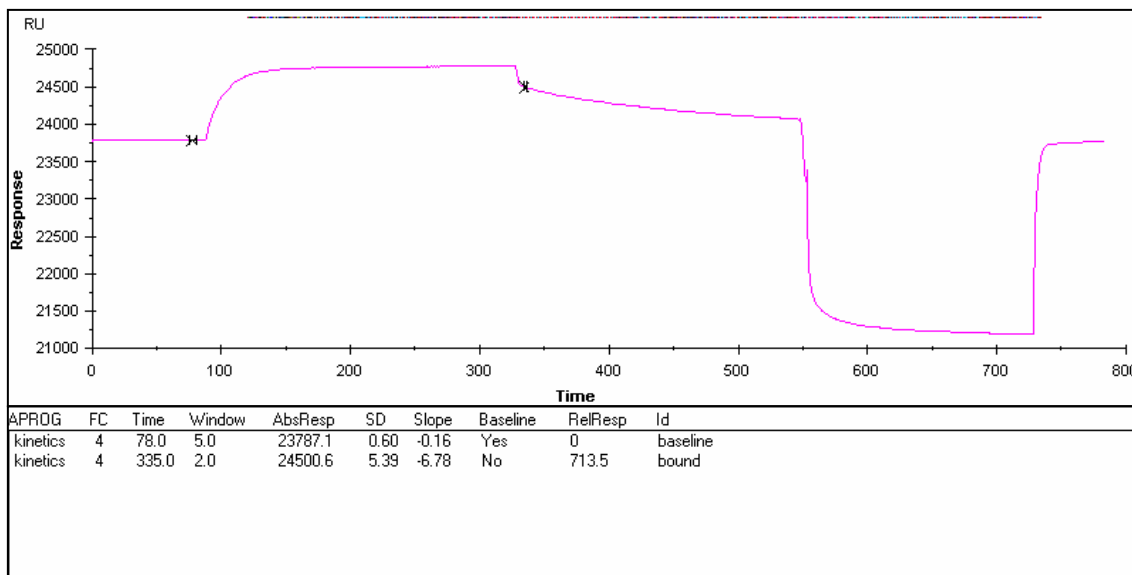
これを少し変形すると、APROG injection をフローセルを変えて実行することができる。

```
DEFINE  APROG  injection
        FLOW          5
        INJECT        R2A1 5
END

MAIN
        DETECTION     1
        APROG         injection
        DETECTION     2
        APROG         injection
        DETECTION     3
        APROG         injection
        DETECTION     4
        APROG         injection
END
```

ステップ 3：　レポートポイントの取り方

レポートポイントを取ることで、センサーグラムの任意の時間における測定値（RU）をセンサーグラム下のレポートポイントテーブルに表示させることができる。（14 ページ参照）

APROG	FC	Time	Window	AbsResp	SD	Slope	Baseline	RelResp	Id
kinetics	4	78.0	5.0	23787.1	0.60	-0.16	Yes	0	baseline
kinetics	4	335.0	2.0	24500.6	5.39	-6.78	No	713.5	bound

レポートポイントは、プログラムでも取得することができる。

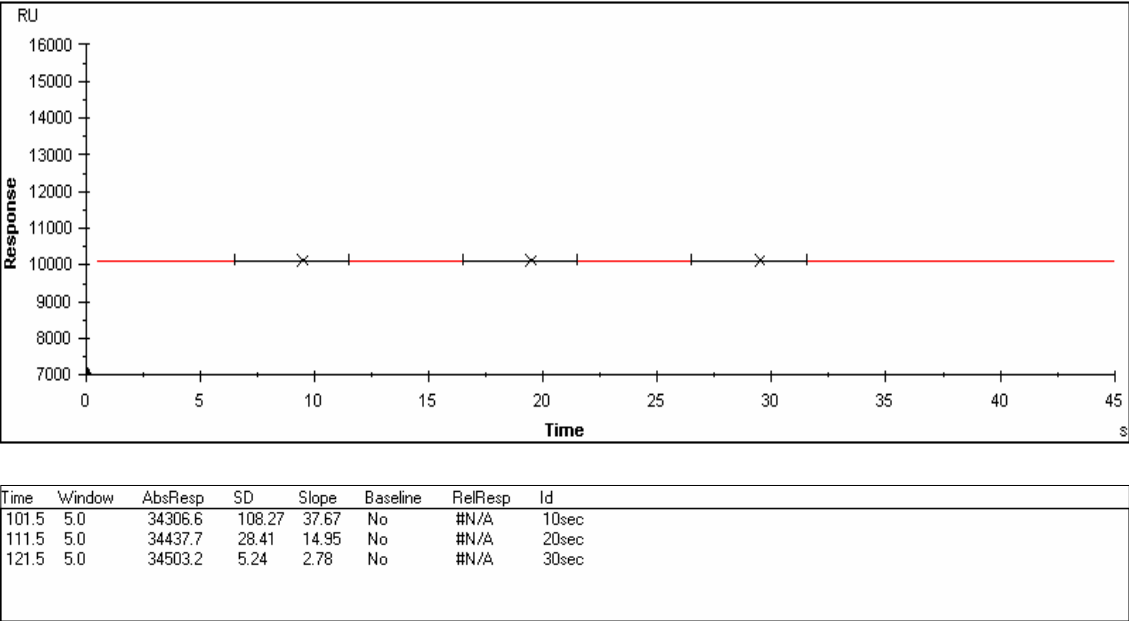
```
DEFINE   APROG   injection
              FLOW              5
0:10          RPOINT            10sec
0:20          RPOINT            20sec
0:30          RPOINT            30sec
END

MAIN
              DETECTION         1
              APROG             injection
END
```

センサーグラムがスタートした後､任意の時間でレポートポイントを取り込む。プログラム中の RPOINT の前の時間がレポートポイントを取り込む時間となる。

0:20　　RPOINT　20sec

この場合には、センサーグラム測定開始から 20 秒後にレポートポイントを作成することになる。

Time	Window	AbsResp	SD	Slope	Baseline	RelResp	Id
101.5	5.0	34306.6	108.27	37.67	No	#N/A	10sec
111.5	5.0	34437.7	28.41	14.95	No	#N/A	20sec
121.5	5.0	34503.2	5.24	2.78	No	#N/A	30sec

プログラム中の RPOINT の右側に入力したもの（例えば 10 sec、20sec、30sec）はコメントとなり、レポートポイントテーブル中に表示される。レポートポイントテーブルの AbsResp はグラフ上の値（絶対値）、RelResp はベースライン（基準値、RU）を設定した場合に、その設定したベースライン（基準値、RU）との差（相対値）になる。レポートポイントは設定した時間を中心とした 5 秒間の平均値として計算される（Window 5）。

（アスタリスクマーク（＊）を使用したレポートポイント取得時間の設定）
レポートポイントの時間をセンサーグラム開始からの時間の設定では紛らわしいので、コマンドの実行開始時間からの設定にすることができる。

```
DEFINE    APROG assay
                FLOW       5
            *   INJECT     R2A1   5
     ---->0:10  RPOINT     10sec
          0:20  RPOINT     20sec
          0:30  RPOINT     30sec
            *   INJECT     R2A1   5
          0:10  RPOINT     10sec
          0:20  RPOINT     20sec
          0:30  RPOINT     30sec
END

MAIN
     DETECTION         1
     APROG             assay
END
```

例えば、上のプログラムの、

0:10　RPOINT　10sec

は、その直前の

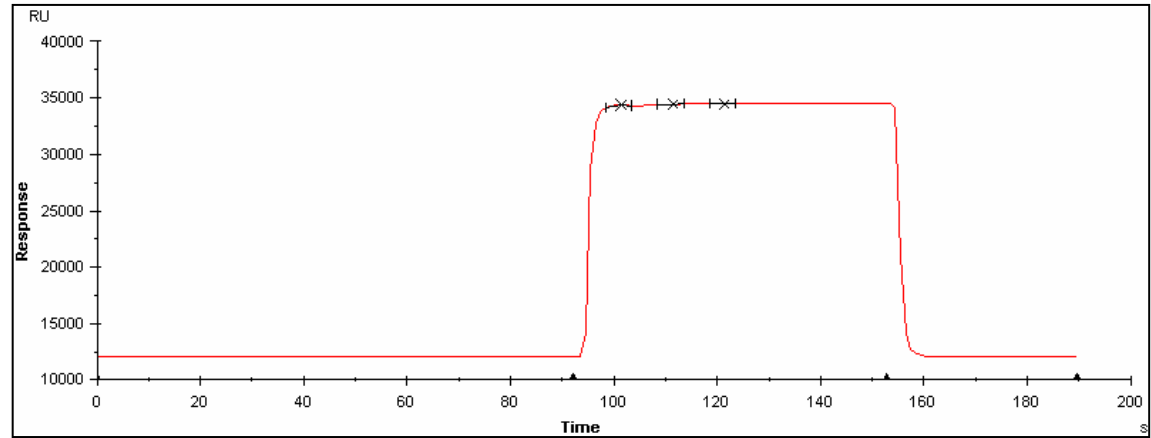
＊　INJECT　R2A1　5

の＊印からの時間、つまり R2A1 のサンプルの添加開始時間から 10 秒後にレポートポイントを作成することになる。上のプログラムでは、さらに 20 秒後、30 秒後にレポートポイントをとる。

（相対値を算出するためのベースライン設定）
サンプルの結合量を表示させる場合には、添加する前の値を基準とし、結合量を基準値との相対値で表示させる。
プログラム中の RPOINT コマンドの後に－b と入力すると、

0:10 RPOINT　10sec　－b

その時取得した値（RU）が 0（RU）となり、それ以後の値が相対値として表示される。

```
DEFINE   APROG assay
         FLOW       5
       * INJECT     R2A1   5
 0:10  RPOINT       10sec -b
 0:20  RPOINT       20sec
 0:30  RPOINT       30sec
 END
```

Time	Window	AbsResp	SD	Slope	Baseline	RelResp	Id
101.5	5.0	34306.6	108.27	37.67	Yes	0	10sec
111.5	5.0	34437.7	28.41	14.95	No	131.1	20sec
121.5	5.0	34503.2	5.24	2.78	No	196.6	30sec

ステップ 4：　検出モードと添加流路の設定

4 つのフローセルをそれぞれ単独に使用する以外に、連続したフローセルに直列に流したり、流路を途中で切り替えることが可能である。これを実行するには以下の 2 つのパラメーターを使用する。

DETECTION　：　検出のモード　（MAIN ブロックで設定）
FLOWPATH　：　流路の設定　（DEFINE APROG ブロックで設定）

それぞれは、以下の組み合わせの中から設定できる。

FLOWPATH (DEFINE APROG)	**DETECTION (MAIN)**
1 **2** **3** **4**	**1** **2** **3** **4**
1,2 **1,2**(フローセル 1 をリファレンスにする場合)	**1,2** **2-1**
1,2,3 **1,2,3**(フローセル 1 をリファレンスにする場合)	**1,2,3,4** **2-1,3-1,4-1**
1,2,3,4 **1,2,3,4**(フローセル 1 をリファレンスにする場合) **1,2,3,4**(フローセル 1,3 をリファレンスにする場合)	**1,2,3,4** **2-1,3-1,4-1** **2-1,4-3**

（注意）流路を 1,2,3 にする場合には、検出モードを 1,2,3,4 と設定する（DETECTION 1,2,3 の設定はできない）。また、フローセル 1 をリファレンスにし、差し引きセンサーグラムを表示する場合には、検出モードに 4-1 も設定しなければならない。

実験の途中で流路を変更することができる。

```
FLOWPATH     1
FLOWPATH     2
FLOWPATH     3
FLOWPATH     4
FLOWPATH     1,2
FLOWPATH     1,2,3
FLOWPATH     1,2,3,4
```

上の中から選択することができる。
途中で流路を変更する場合には、検出モードは、必ず変更する流路を含む設定にする。

```
DEFINE   APROG       path
     FLOW            10
     FLOWPATH        1
     FLOWPATH        2
     FLOWPATH        3
     FLOWPATH        4
END

MAIN
     DETECTION        1,2,3,4
     APROG            path
END
```

上のプログラムはスタート後、流路が順番に変更される。

```
DEFINE   APROG            path
         FLOW                10
         FLOWPATH             1
         INJECT     R2A1     10
         FLOWPATH             2
         INJECT     R2A1     10
         FLOWPATH             3
         INJECT     R2A1     10
         FLOWPATH             4
         INJECT     R2A1     10
END

MAIN
         DETECTION           1,2,3,4
         APROG               path
END
```

上のプログラムの場合、**FLOWPATH 1** に **R2A1** を添加し、さらに、**FLOWPATH 2**、**FLOWPATH 3**、**FLOWPATH 4** と随時流路を変更し、R2A1 のサンプルを添加する。

ステップ 5：　固定化プログラム

C：＼Program Files＼BIACORE 2000＼Guide＼Methods とフォルダーを開き、固定化のプログラムである **Amine.blm** をクリックし、ファイルを呼び出す。

```
DEFINE APROG immob
CAPTION Amine coupling
            FLOW          10
            DILUTE        R2B1 R2B2 R2B3 50
    *       INJECT        R2B3   70
-0:10       RPOINT        baseline -b
            INJECT        R2A1   70
            INJECT        R2B4   70
    *       INJECT        R2F3   10
 2:00       RPOINT        immob
END

MAIN
            RACK          1 thermo_b RACK1 thermo_b
            RACK          2 thermo_a
            DETECTION     2
            APROG         immob
            APPEND        standby
END
```

MAIN を順番に実行する。**RACK1** thermo_b はラックベースの設定であるが、あらかじめ **Command → Rack Base** で設定している場合には、削除しても差し支えない。DEFINE APROG 中には、流路の設定を行っていないが、流路を設定しない場合には、検出モードで設定した流路を流れる。

DETECTION　1	FLOWPATH　1
DETECTION　2	FLOWPATH　2
DETECTION　3	FLOWPATH　3
DETECTION　4	FLOWPATH　4
DETECTION　1,2,3,4	FLOWPATH　1,2,3,4

（説明）
DEFINE APROG　ブロック
CAPTION
センサーグラムの上に表示されるタイトル。この場合、Amine coupling となる。

FLOW 10
流速を 10 µl/min に設定する。

DILUTE　R2B1 R2B2 R2B3 50
NHS と EDC の混合液を調製する。 **R2B1** に EDC 溶液を **R2B2** に NHS 溶液をセット（逆でも可）し、**R2B3** に混合するための空容器をセットする。50 は R2B1 のサンプルの混合割合であり、この場合 50%である。この混合液は計 200µl 作製される。

INJECT　R2B3　70
R2B3 で作成した混合液 70 µl を添加する。流速が 10 µl/min なので 7 分間の接触時間になる。混合液消費量は、70 µl＋30 µl。

INJECT　R2A1　70
R2A1 にセットされたリガンドを 70 µl 添加する。消費量は、70 µl＋30 µl。

INJECT　R2B4　70
R2B4 にセットされたエタノールアミンを 70 µl 添加する。消費量は、70 µl＋30 µl。
(通常は NHS 活性化時間と同じ時間にする)。

INJECT　R2F3　10
洗浄溶液を添加する（リガンドの非特異的吸着を洗う。リガンドにより省略する）。
（例）50ｍM　NaOH　等
消費量は、（添加容量）µl＋30 µl。

MAIN ブロック

DETECTION　1

検出モードをフローセル 1 に設定する。

APROG　immob

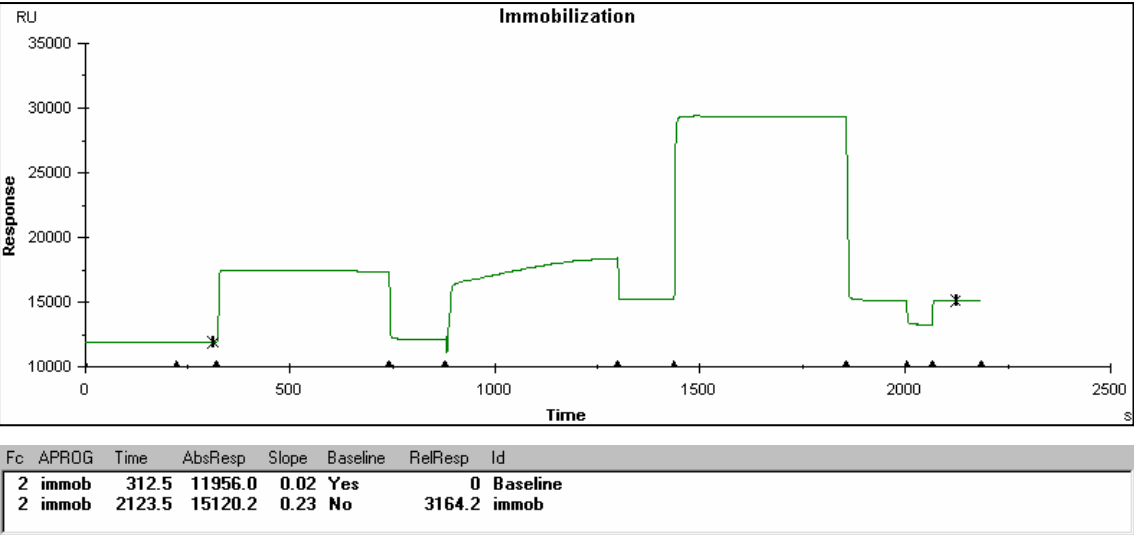
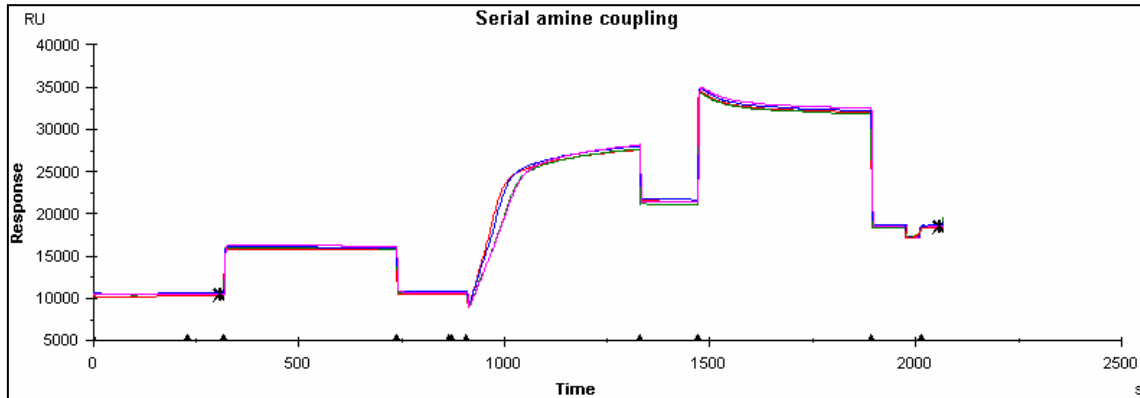
immob を実行する。

APPEND　Standby

プログラムを終了後、Standby を実行する。（すべてのフローセルに 5 µl/min の流速でランニング緩衝液を流すコマンド。51 ページ参照）。

プログラム実行時は、通常、最後に **APPEND Standby** を使用する。

このプログラムを実行すると、通常以下のような結果が得られる。

Fc	APROG	Time	AbsResp	Slope	Baseline	RelResp	Id
2	immob	312.5	11956.0	0.02	Yes	0	Baseline
2	immob	2123.5	15120.2	0.23	No	3164.2	immob

（複数のフローセルに同じリガンドを固定化するプログラム）
72 ページのプログラムにおいて**検出モード**を **1,2,3,4** に変更すると 4 個のフローセルに同時に固定化を行うことができる。この場合流速を 20 µl/min 以上に上げる（但し、接触時間は変更しない）ことで、フローセル間のタイムラグを短縮し、それぞれの固定化量を再現よく得ることができる。

```
DEFINE APROG immob
CAPTION amine coupling（Fc=1,2,3,4）
          FLOW          20
          DILUTE        R2B1 R2B2 R2B3 50
   *      INJECT        R2B3    140
-0:10     RPOINT        baseline -b
          INJECT        R2A1    140
          INJECT        R2B4    140
   *      INJECT        R2F3    20
 2:00     RPOINT        immob
END

MAIN
          DETECTION     1,2,3,4
          APROG         immob
          APPEND        standby
END
```

（それぞれのフローセルに異なるリガンドを固定化するプログラム）
下のプログラムは、2 個のフローセルについて、同時に NHS 活性化した後に、各フローセルに別々のリガンドをカップリングし、さらに 2 つのフローセルを同時にエタノールアミンでブロッキングするものである。

```
DEFINE APROG immob
CAPTION amine coupling
          FLOW          10
          FLOWPATH      1,2
          DILUTE        R2B1 R2B2 R2B3 50
   *      INJECT        R2B3   70
-0:10     RPOINT        baseline -b
          FLOWPATH      1
          INJECT        R2A1   70
          FLOWPATH      2
          INJECT        R2A2   70
          FLOWPATH      1,2
          INJECT        R2B4   70
   *      INJECT        R2F3   20
 2:00     RPOINT        immob
END

MAIN
          DETECTION     1,2
          APROG         immob
          APPEND        standby
END
```

活性化された NHS 基の安定性は悪いため、上記のようなプログラムで行うと、後半の固定化量が少なくなる傾向がある。同一条件で異なるリガンドを固定化する場合には、**NHS の活性化から別々に行う以下のプログラムを推奨する。**

このプログラムでは、2 個の DEFINE APROG を作成し、それぞれの DEFINE APROG をフローセルを変更して実行する。

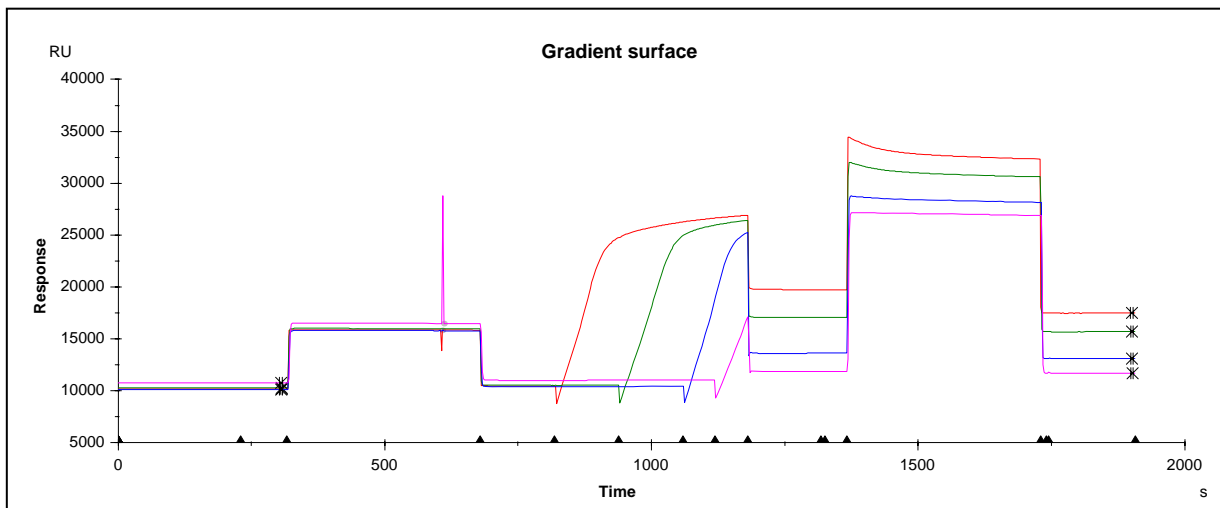
```
DEFINE APROG immob１
CAPTION Amine coupling（FLOWCELL１）
          FLOW         10
          DILUTE       R2B1 R2B2 R2B3 50
   *      INJECT       R2B3   70
-0:10     RPOINT       baseline -b
          INJECT       R2A1   70
          INJECT       R2B4   70
   *      INJECT       R2F3   20
 2:00     RPOINT       immob
END

DEFINE APROG immob２
CAPTION Amine coupling（FLOWCELL２）
          FLOW         10
          DILUTE       R2B5 R2B6 R2B7 50
   *      INJECT       R2B7   70
-0:10     RPOINT       baseline -b
          INJECT       R2A2   70
          INJECT       R2B8   70
   *      INJECT       R2F4   10
 2:00     RPOINT       immob
END

MAIN
          DETECTION    1,2
          APROG        immob1
          DETECTION    2
          APROG        immob2
          APPEND       standby
END
```

(4 つのフローセルにリガンドの固定化量を変えて固定化するプログラム)
各フローセルでリガンドの添加時間を変えて固定化量を変化させることができる。検出モードを **1,2,3,4** に設定し、リガンドの添加のコマンドを以下のように変更する。

INJECT R2A1 70,35,20,10

リガンドはフローセル 1,2,3,4 にそれぞれ 70 µl、35µl、20 µl、10 µl 流れる。

```
DEFINE APROG immob
CAPTION Amine coupling
            FLOW          20
            DILUTE        R2B1 R2B2 R2B3 50
   *        INJECT        R2B3   70
-0:10       RPOINT        baseline -b
            INJECT        R2A1   70,35,20,10
   *        INJECT        R2B4   70
 8:00       RPOINT        immob
END

MAIN
            DETECTION     1,2,3,4
            APROG         immob
            APPEND        standby
END
```

ステップ 6：　相互作用プログラム

相互作用のプログラムは基本的に固定化のプログラムと同様である。ここで、サンプルを 2 分間添加するプログラムを作成してみる。
ここでは、R2A1 に置いたサンプルを添加するプログラムを作成する。

```
DEFINE APROG assay
        FLOW            20
        INJECT          R2A1   40
END

MAIN
        DETECTION       1
        APROG           assay
        APPEND          standby
END
```

（変数を使ったプログラムの作成）

通常の相互作用測定では、アナライトは複数個あり、各アナライトの位置が毎回変わる。次に 3 つのアナライトを測定するプログラムを作成する。下のプログラムの場合、アナライトは R2A1、R2A2、R2A3 にある。

```
DEFINE APROG assay
PARAM   %pos
        FLOW            20
        INJECT       %pos   40
END

MAIN
        DETECTION     1
        APROG           assay     R2A1
        APROG           assay     R2A2
        APROG           assay     R2A3
        APPEND          standby
END
```

Biacore のプログラムでは、変数を%として代用することができる。アナライトの位置が毎回異なるので、**INJECT　%pos** と入力する。プログラム中に変数を使用する場合は、予め、プログラム上段に **PARAM　%pos** と規定する。**MAIN** ブロックに **APROG assay R2A1** と入力すると、**R2A1** がアナライトの位置（%pos）になり、2 回目は **R2A2**、3 回目は **R2A3** がアナライトの位置のみを変化させることができる。このようなプログラムを作成すると、サンプル位置が異なる複数のアナライトについて、短いプログラムで分析を行うことができる。アナライト数を増やす場合には、**APROG　assay**（サンプル位置）をコピー/ペーストして MAIN ブロックに追加する。
通常の相互作用検討の場合は、アナライト添加後、結合したアナライトを再生溶液で解離させるので、以下のようなプログラムになる。

```
DEFINE APROG assay
PARAM    %pos
           FLOW                       20
   *       INJECT                     %pos   40
-0:10      RPOINT                     baseline –b
 2:20      RPOINT                     bound
   *       INJECT                     R2F3    20
 2:00      RPOINT                     regeneration
END

MAIN
           DETECTION                  1
           APROG                      assay   R2A1
           APROG                      assay   R2A2
           APROG                      assay   R2A3
           APPEND                     standby
END
```

（変数が **2** つ以上あるプログラムの作成）
プログラムの中に変数が 2 つ以上ある場合でも基本的に同じ方法をとる。例えば、アナライトの位置と添加容量の 2 つのパラメーターが毎回変化するプログラムは以下のようになる。
アナライトは R2A1、R2A2、R2A3 の 3 つで、それぞれを 10 µl、20 µl、30 µl と異なった量を添加する。

```
DEFINE APROG assay
PARAM    %pos %vol
         FLOW            20
   *     INJECT          %pos %vol
-0:10    RPOINT          baseline –b
 2:20    RPOINT          bound
   *     INJECT          R2F3    20
 2:00    RPOINT          regeneration

MAIN
         DETECTION       1
         APROG           assay   R2A1   10
         APROG           assay   R2A2   20
         APROG           assay   R2A3   30
         APPEND          standby
END
```

位置に関する変数を**% pos**、容量に関する変数を**% vol** とし、2 個使用する。
PARAM　% pos　% vol と予め規定し、**INJECT　% pos　% vol** と入力する。
さらに、**MAIN** ブロック中の **APROG assay** の後に**% pos　% vol** の順番でそれぞれを入力する。

つまり、1 回目は、R2A1 の位置で 10 µl（ APROG assay　**R2A1　10**）
2 回目は、R2A2 の位置で 20 µl（ APROG assay　**R2A2　20**）
3 回目は、R2A3 の位置で 30 µl（ APROG assay　**R2A3　30**）
と添加する。

APROG の後は、**PRAM** で設定した変数内容の順番で入力する。

（相互作用測定のための基本的なプログラム）
実験モデルとして以下の条件を想定する。

フローセル 1　　：リファレンスセル
フローセル 2　　：抗体固定化セル
アナライト　　　：抗原（2 種類、各 2 段階濃度）
　Antigen_1　25 μg/ml
　Antigen_1　12.5 μg/ml
　Antigen_2　25 μg/ml
　Antigen_2　12.5 μg/ml

```
DEFINE APROG    assay
PARAM      %pos    %id    %conc
CAPTION    Binding of %id  (%conc) to immobilized antibody
           FLOW            20
     *     KINJECT         %pos    60      180
-0:10      RPOINT          baseline      -b
 3:20      RPOINT          bound
     *     INJECT          R2F3      20
 2:00      RPOINT          regeneration
END

MAIN       DETECTION       2-1
           APROG           R2A1    antigen_1     25ug/ml
           APROG           R2A2    antigen_1     12.5ug/ml
           APROG           R2A3    antigen_2     25ug/ml
           APROG           R2A4    antigen_2     12.5ug/ml
           APPEND          standby
END
```

このプログラム上で変数となるのは、アナライトの位置のみであるが、%id（サンプルの名前）および% conc（サンプル濃度）を変数として入力することで、各アナライトの名前および濃度をセンサーグラム上のタイトルとして表示することができる。**CAPTION　Binding of % id（%conc) to immobilized antibody** を記載しておくと、センサーグラムのタイトルに% id と% conc がサイクル毎に代入される。１つめのアナライトでは、タイトルが

“Binding　of　Antigen_1（25 ug/ml) to immobilized antibody”

となり、2 つめのアナライトでは、

“Binding　of　Antigen_1（12.5 ug/ml) to immobilized antibody”

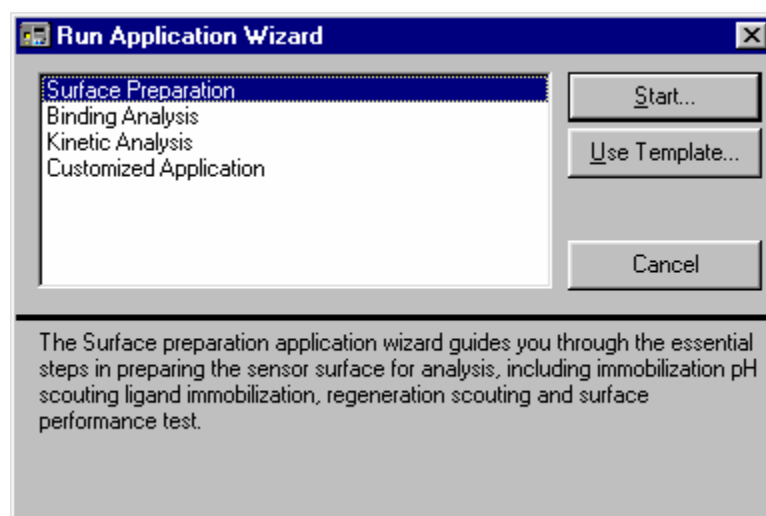
となり、タイトルを見るだけで、どのアナライトについて測定したセンサーグラムか簡単に見分けが付く。

実際このプログラムでは、変数がアナライトの位置だけなので、タイトル表示やサンプルの記載等を必要としない場合には、アナライトの位置だけの変数を用いても測定可能である。

```
DEFINE APROG assay
PARAM    %pos
         FLOW            20
         FLOWPATH        1,2
   *     INJECT          %pos   40
-0:10    RPOINT          baseline -b
 2:20    RPOINT          bound
   *     INJECT          R2F3   20
 2:00    RPOINT          regeneration
END

MAIN
         DETECTION       2-1
         APROG           assay  R2A1
         APROG           assay  R2A2
         APROG           assay  R2A3
         APPEND          standby
END
```

9.Application Wizard を使用した実験方法

汎用性の高い各種実験方法に関して、Wizard が付属されている。Wizard とは、測定プログラム作成のためのサポートツールである。目的の実験項目となる Wizard を選択し、画面の指示に従い必要事項を入力し、指示量のサンプルをラックにセットし、Start ボタンをクリックすると測定が開始される。Wizard の実験項目には以下のものがある。

① Surface preparation

固定化実験から、固定化リガンドの安定性試験まで、チップ表面に関与する実験項目が含まれる。

1. Immobilization pH scouting

固定化前にリガンド希釈液を選択するための wizard。

2. Immobilization

固定化 wizard。固定化量の調節等が簡単にできる。

3. Regeneration scouting

リガンドの再生条件を検討する wizard。

4. Surface performance test

決定した再生条件でのリガンド安定性試験のための wizard。

② Binding analysis

固定化終了後、各種アナライトの結合の有無を調べる wizard。リガンド結合分子のスクリーニングやエピトープマッピングに便利である。

③ Kinetic analysis

解離定数（k_D,単位 M）、反応速度定数（k_a,単位 $M^{-1}s^{-1}$ 、k_d,単位 s^{-1}）を算出に関与する実験項目が含まれる。実験系の評価から、実際の定数算出までを含む。

1. Concentration series

おおよその結合速度定数（k_a、単位 $M^{-1}s^{-1}$）および解離速度定数（k_d、単位 s^{-1}）を算出する wizard。

2. Control experiments

Mass transfer control

マストランスポートリミテーションの有無を評価する wizard。

Linked reaction

１：１の反応なのか否かを評価する wizard。

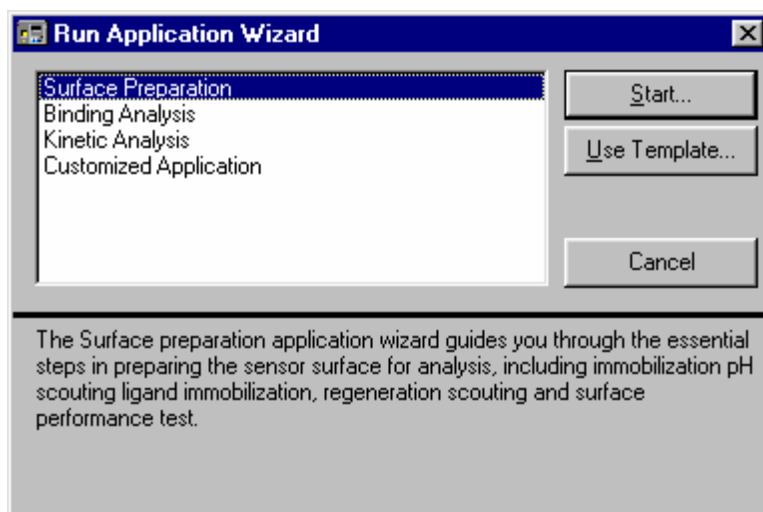
④ Customized Application

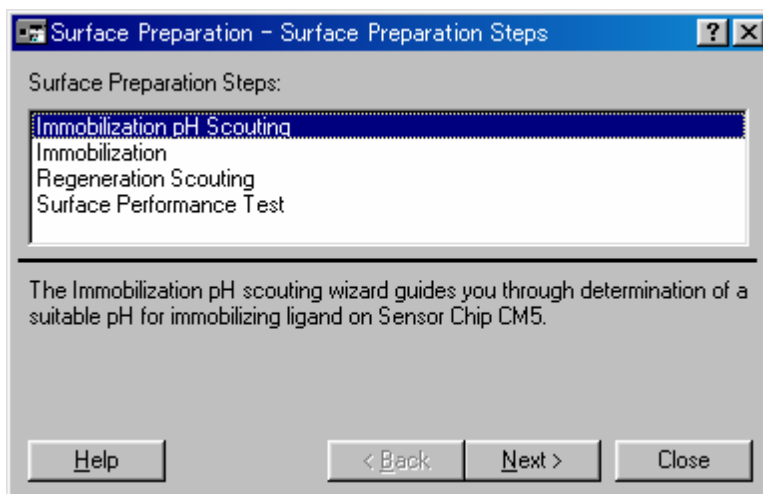
任意に実験を組み立てるための wizard。複雑な実験を簡単に作成できる。

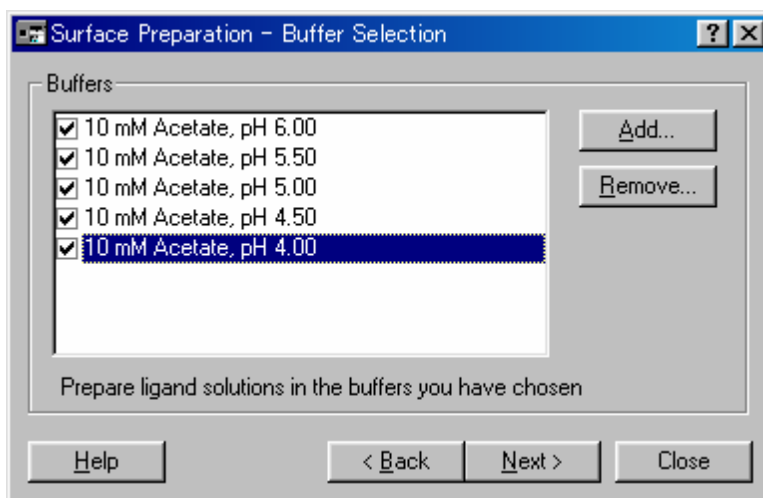
9-1. プレコンセントレーションの検討 (Immobilization pH Scouting)

固定化前に、リガンド希釈液（10mM 酢酸緩衝液）の検討を行う wizard。各種 pH の 10mM 酢酸緩衝液に希釈したリガンドをセンサー表面に添加し、デキストランへの濃縮の程度を見る。

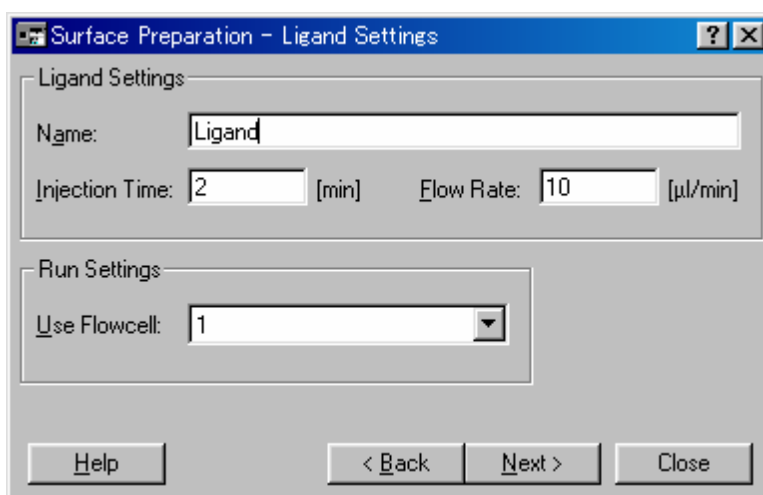
Run → **Run Application Wizard...**をクリックする。

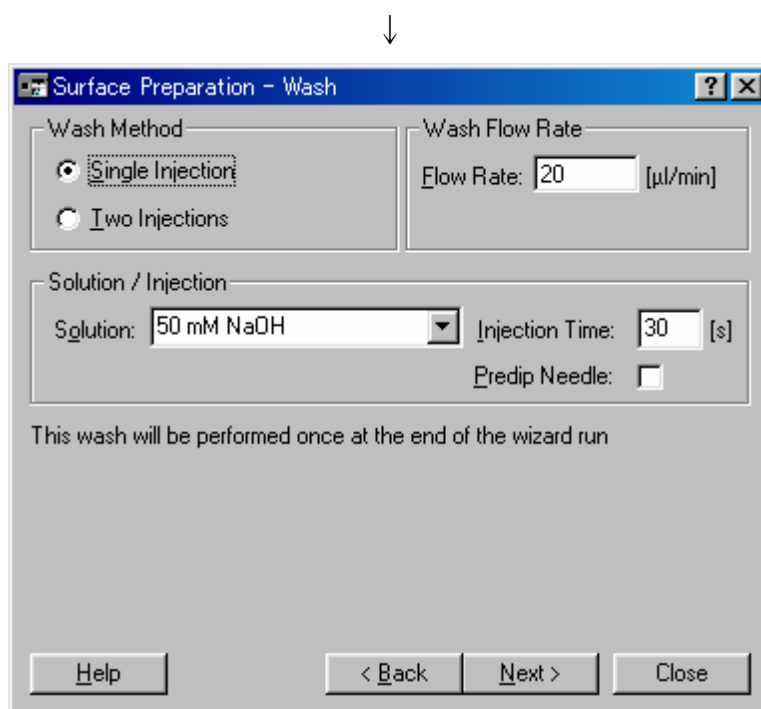
↓

Surface Preparation を選択し、**Start**...をクリックする。

↓

Immobilization pH Scouting を選択し、**Next**>をクリックする。

↓

検討する酢酸緩衝液の pH にチェックを入れ、**Next**>をクリックする。

> リガンドの安定性が最も重要である。リガンドの pH 安定性が予めわかっている場合は、活性が保持される pH で検討を行う。また、pH3.5 以下の緩衝液は使用しない。プレコンセントレーション効果が見られる pH は pH6～4 の範囲にある場合が多い。
> 表示された緩衝液以外を使用する場合には、**Add...**をクリックして設定する。

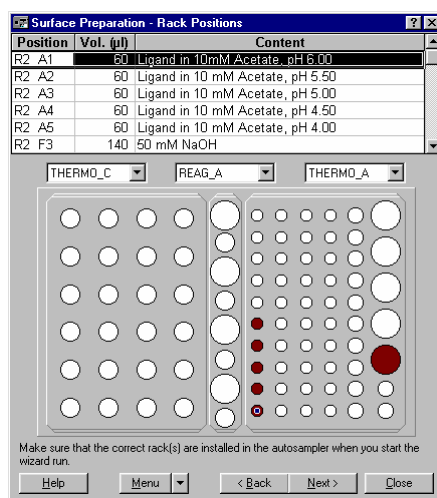
↓

リガンド名、添加時間（分）、流速（µl/min）、検討に使用するセル（固定化予定のセル）を選択し、**Next**>をクリックする。

↓

リガンド添加終了後、センサーチップ表面に非特異的に吸着したリガンドを洗浄する。

洗浄溶液名および条件を入力し、**Next**>をクリックする。

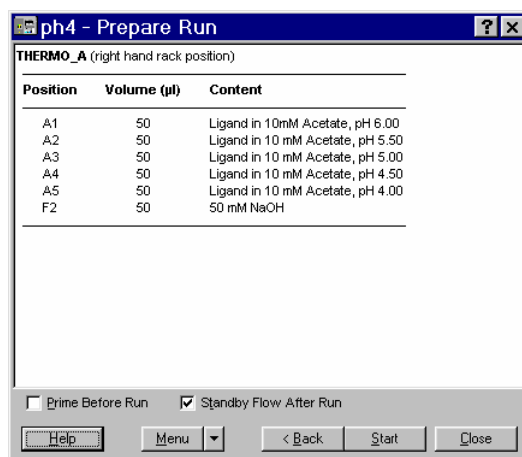
通常、**Single Injection**、**20～60µl/min**、**50mM NaOH**、**30sec** の条件で添加する。2 種類の洗浄溶液を使用する場合には、**Wash Method** の **Two Injections** を選択する。

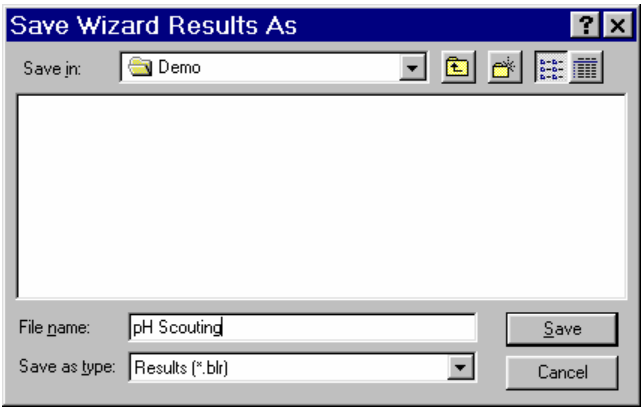
> 洗浄溶液の添加は最後のリガンド添加終了後に実施される。それぞれの **pH** のリガンド添加毎の実施はしない。

↓

サンプル、試薬の位置がラック上に表示される。

> バイヤルのセット位置を変更する場合には、ラック上のバイヤルにカーソルを移動し､ドラッグし別の場所に移動する。その場合には、上部表中のサンプル位置も自動的に変更される｡サンプル位置の変更にともない、バイヤルの大きさが変わる場合には、サンプル必要量も変更されるので注意すること。
> 作成した wizard を保存すると場合は、**Menu▼** → **Template Save As...**を実行する。

サンプル、試薬セット後、**Nest>**をクリックする。

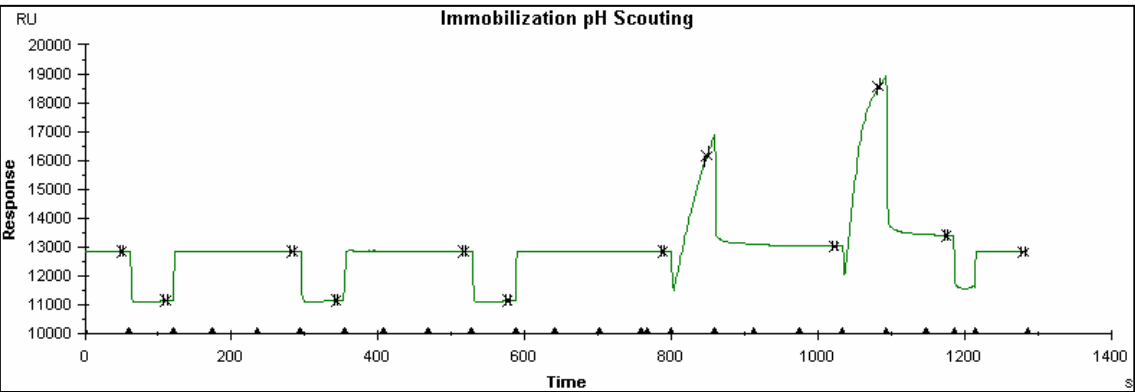
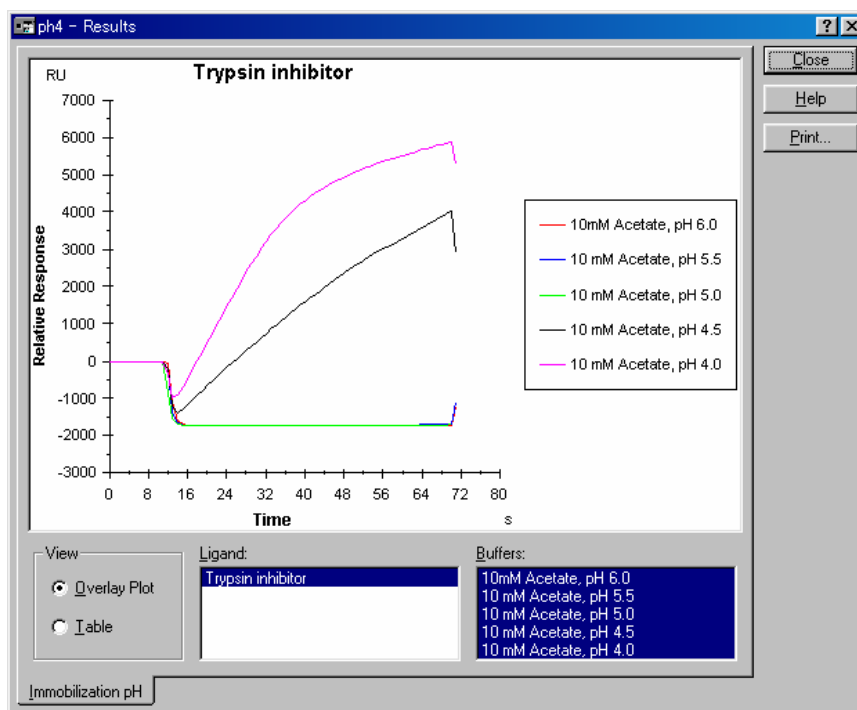
↓

サンプルの位置、容量の再確認を行う。実験終了後は引き続き Standby を実行するが推奨される。Standby Flow After Run にチェックを入れる。また、実験前に Prime を実行する場合には Prime Before Run にチェックを入れる。**Start** をクリックする。

↓

保存先のフォルダーを指定し、ファイル名を入力し、**Save** をクリックする。

↓

実験がスタートする。

（実験結果の表示）

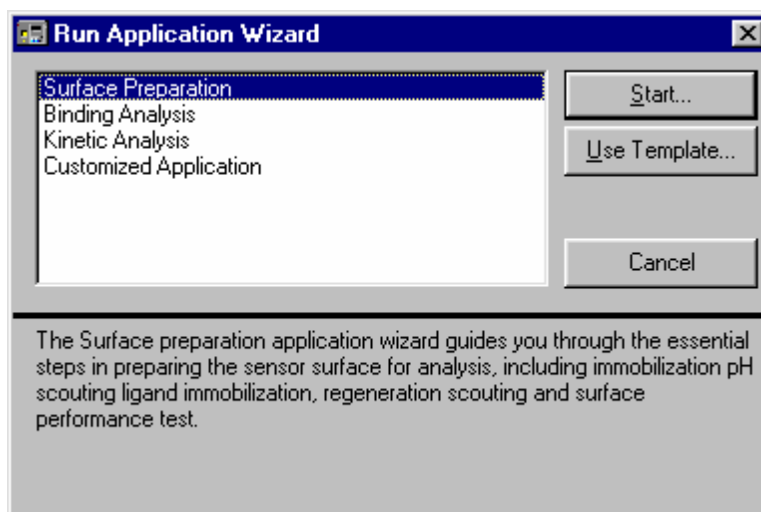
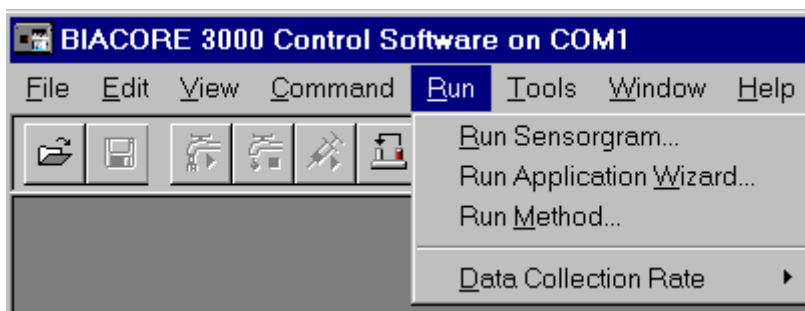
実験が終了すると、以下のような結果が表示される。

Fc	APROG	Time	AbsResp	Slope	Baseline	RelResp	Id	Ligand
2	ImmobPH	50.5	12874.8	-0.02	Yes	0	Baseline1	Trypsin inhibitor
2	ImmobPH	110.5	11153.6	0.58	No	-1721.2	10mM Acetate, pH 6.00	Trypsin inhibitor
2	ImmobPH	283.5	12872.6	-0.01	Yes	-2.2	Baseline2	Trypsin inhibitor
2	ImmobPH	343.5	11160.2	0.71	No	-1712.4	10 mM Acetate, pH 5.50	Trypsin inhibitor
2	ImmobPH	517.5	12874.1	-0.02	Yes	1.5	Baseline3	Trypsin inhibitor
2	ImmobPH	577.5	11153.8	0.41	No	-1720.3	10 mM Acetate, pH 5.00	Trypsin inhibitor
2	ImmobPH	788.5	12873.7	-0.01	Yes	-0.4	Baseline4	Trypsin inhibitor
2	ImmobPH	848.5	16126.0	73.68	No	3252.3	10 mM Acetate, pH 4.50	Trypsin inhibitor
2	ImmobPH	1022.5	13047.5	-0.28	Yes	173.8	Baseline5	Trypsin inhibitor
2	ImmobPH	1082.5	18542.7	39.51	No	5495.2	10 mM Acetate, pH 4.00	Trypsin inhibitor
2	ImmobPH	1175.5	13408.4	-1.21	Yes	361.0	PreRegen	Trypsin inhibitor
2	ImmobPH	1280.5	12836.8	-0.16	No	-571.6	Regeneration	Trypsin inhibitor

上記の結果から使用する pH を決める。

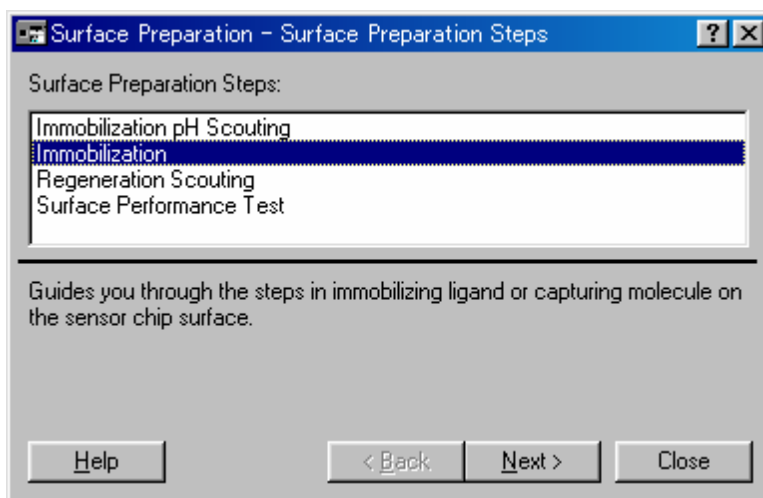
（結果の評価）

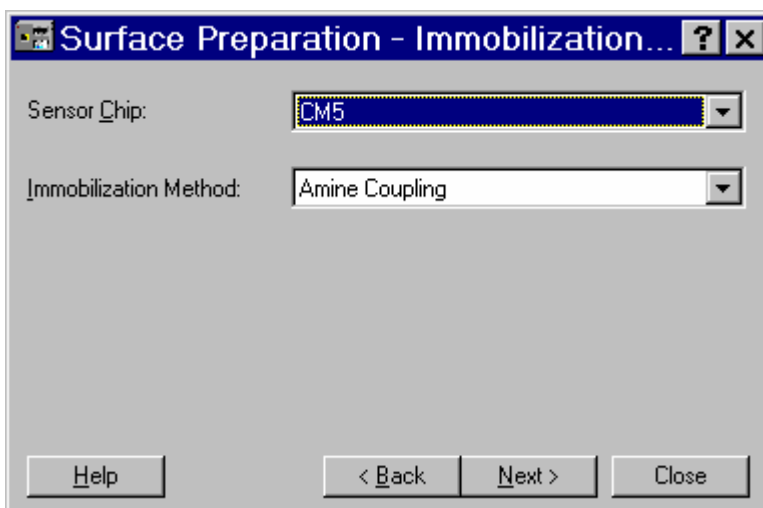
必要固定化量（RU）を充分越える pH の中で、最も中性に近い pH を選択する。リガンドの安定性を重要視する。検討したリガンド濃度において必要充分量（RU）のプレコンセントレーション効果が得られない場合は、リガンド濃度を上げ、再検討する。

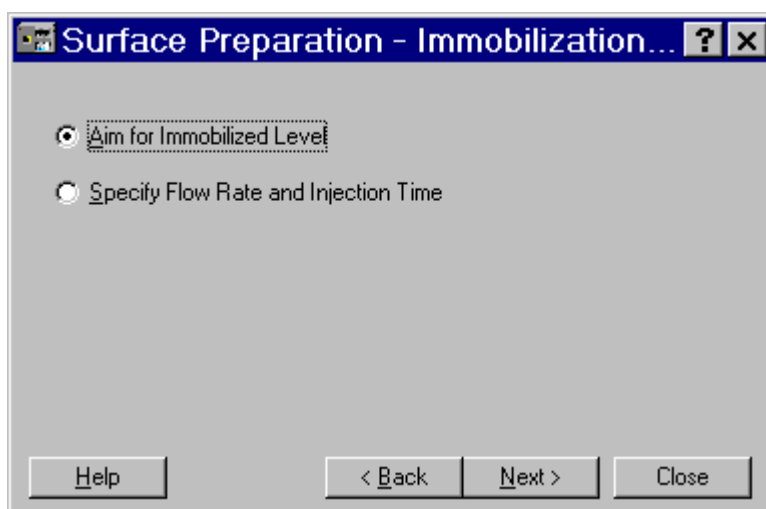
9-2. リガンドの固定化(Immobilization)

アミンカップリングによりリガンドを固定化する wizard。その他の固定化方法（チオールカップリング、アルデヒドカップリング）については、Wizard Template（165 ページ）を使用する。

Run → **Run Application Wizard...**をクリックする。

Surface Preparation を選択し、**Start...**をクリックする。

↓

Immobilization を選択し、**Next**>をクリックする。

↓

CM5、**Amine Coupling** を選択し、**Next**>をクリックする。

↓

Aim for Immobilized Level（95 ページ参照）

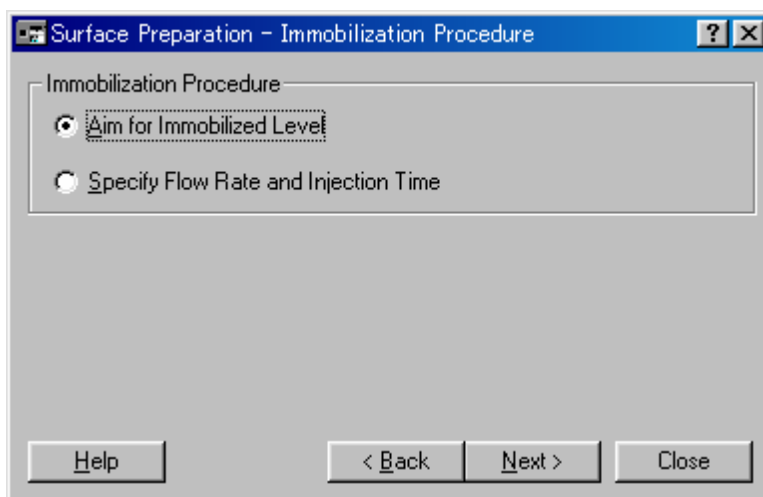
目的の固定化量に調節しながら固定化する場合に選択する。

Specify Flow Rate and Injection Time（101 ページ参照）

リガンド添加時の流速と添加時間を指定し、固定化する場合に選択する。

いずれかを選択し、**Next**>をクリックする。

9-2-1. 固定化量を調整しながらの固定化（Aim for Immobilized Level）

> 流速は **5μl/min**、**NHS** 活性化時間、エタノールアミンによるブロッキング時間はそれぞれ **7** 分間に固定されており変更はできない。

Aim for Immobilized Level 選択し、**Next**>をクリックする。

↓

固定化するリガンド名を固定化するフローセルに入力し、目的の固定化量（RU)、リガンド溶液のテスト添加（プレコンセントレーション）後の洗浄溶液（通常、50mM　NaOH）を入力し、**Next**>をクリックする。

リガンド溶液のテスト添加とは、NHS 活性化前のセンサーチップ表面にリガンド溶液を添加する作業のことである。そのプレコンセントレーション効果をモニターし、目的の固定化量（RU）が得られるリガンド溶液状態であるかを評価する。明らかに目的の固定化量を得られないと判断した場合には、NHS 活性化前に wizard は中断する。**50mM NaOH による洗浄は、リガンド溶液のテスト添加直後（NHS 活性化前）に、非特異的に吸着したリガンドを取り除くために実施される。固定化後のセンサーチップ表面には流れない。**

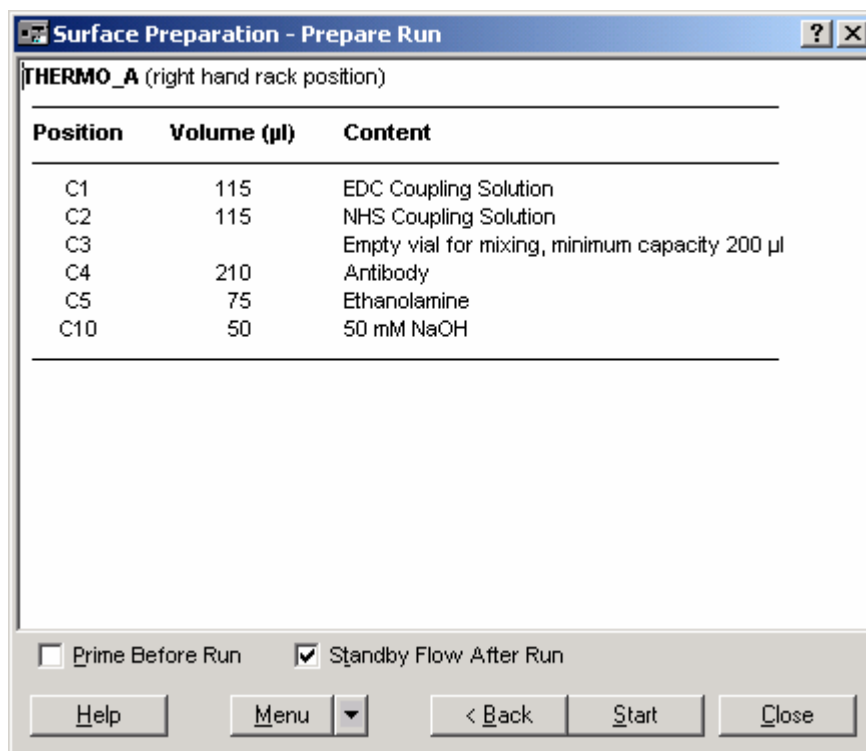
補足 21. 複数のフローセルに同時に固定化する方法

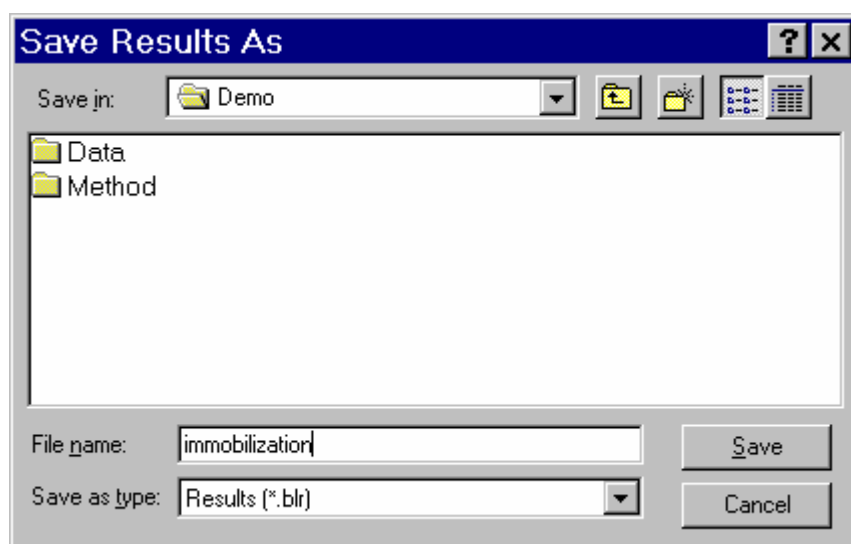
① 複数リガンドの固定化を同時に行う場合には、それぞれのフローセルにリガンド名と目的の固定化量を入力する。

② フローセル 1 および 3 は、ブランクセルとして使用することができる。Blank にチェックすると、NHS 活性化後、エタノールアミンでブロッキングしたセルを作成する。

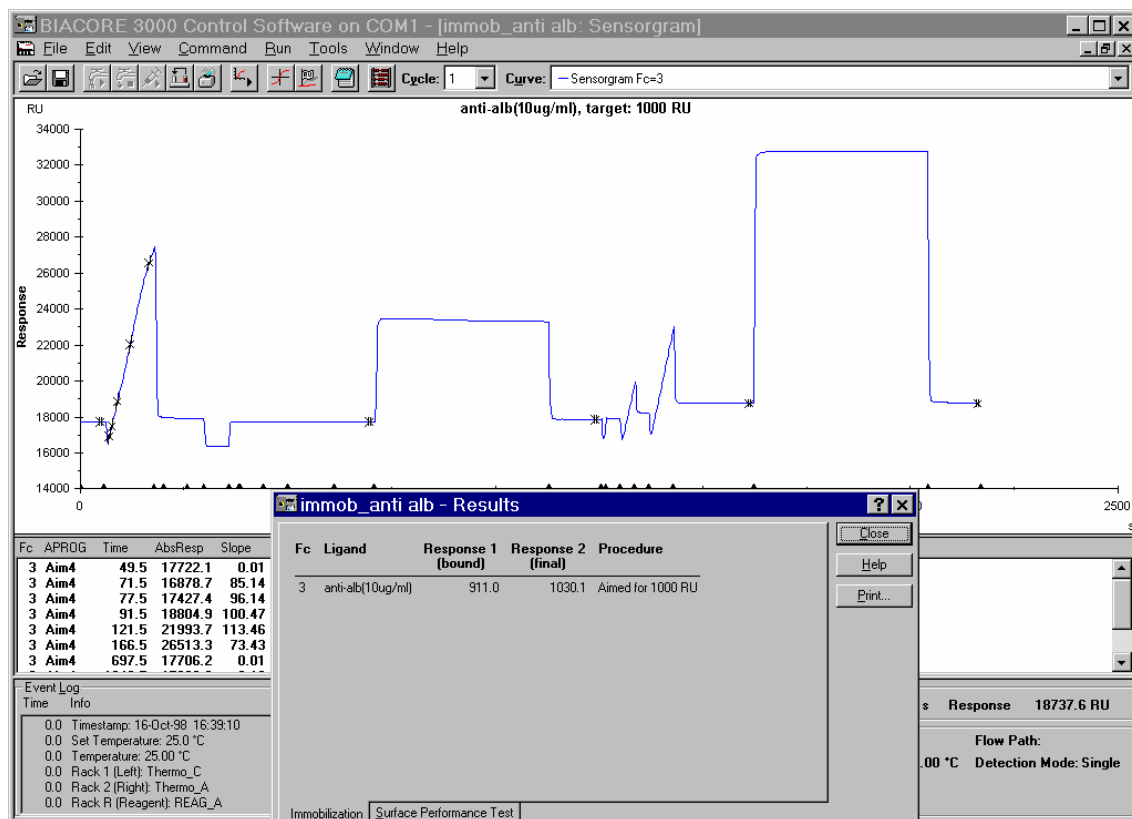
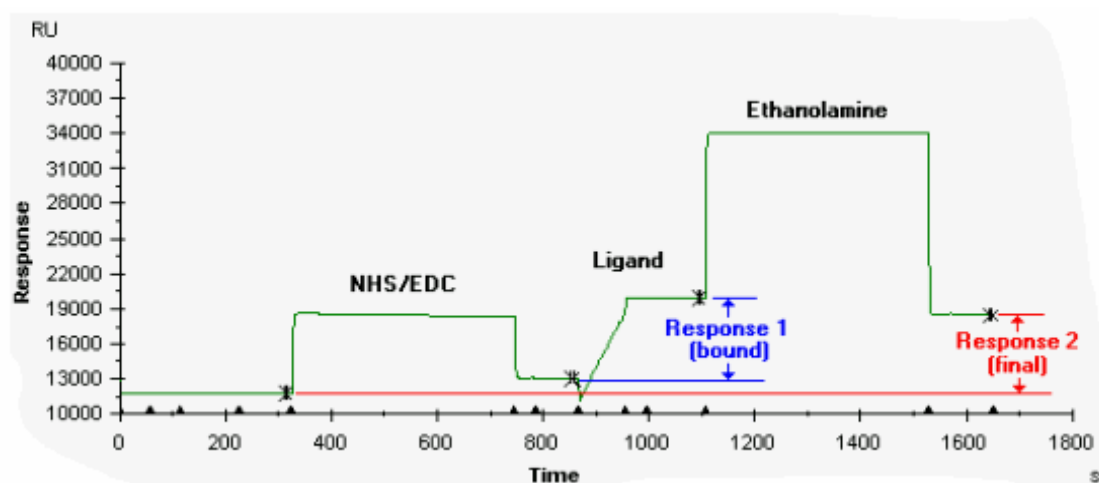
③ 何も処理していないフローセルをリファレンスセルにする場合には、この画面上では何の設定も行わない。

リガンド、試薬の位置がラック上に表示される。セット後 **Next>**をクリックする。

↓

バイヤル位置、容量を再度確認し、Standby Flow After Run にチェックを入れる。必要があれば、Prime Before Run にもチェックを入れる。**Start** をクリックする。

↓

保存先のフォルダーを選択し、ファイル名を入力し、**Save** をクリックする。

↓

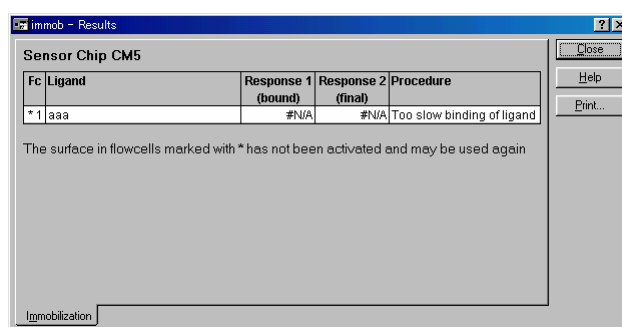
固定化が開始される。

固定化が終了すると、上記の様なレポートが表示される。

Response 1.　リガンド添加の前後でのレスポンスの差（RU）

Response 2.　NHS 活性前とエタノールアミン添加後のレスポンスの差（RU）

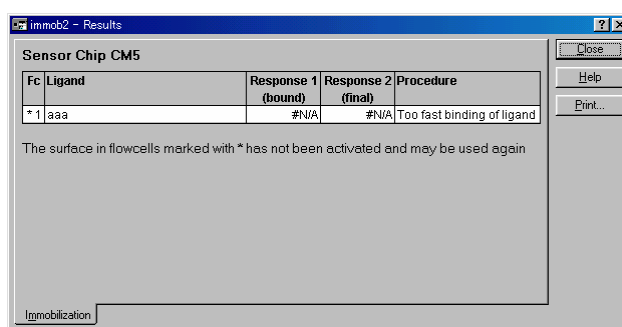
固定化量が少ない場合（**1000RU** 以下）には **Response 1.**を参考にする。

補足 22. 固定化 wizard の中断

この Wizard では、NHS 活性化する前に、リガンド溶液をフローセルにテスト添加し、プレコンセントレーション効果が得られるか？そして、その結果から目的の固定化量に調整できるリガンド溶液状態であるかを判断する。
セットしたリガンド溶液に問題がある場合には、この時点でプログラムが自動的に終了する。この場合、フローセルにはリガンドは固定化されていないので、リガンド溶液を調製しなおして、同じフローセルに再度固定化を試みる。

① プレコンセントレーション効果が不充分な場合

テスト添加においてリガンド溶液のプレコンセントレーション効果が観察されなかった場合、もしくはあまりにも濃縮がゆるやかなため、添加時間を長くしても目標のレベルまで固定化できそうもないと判断される場合は上のようなメッセージが表示され、固定化が中断される。

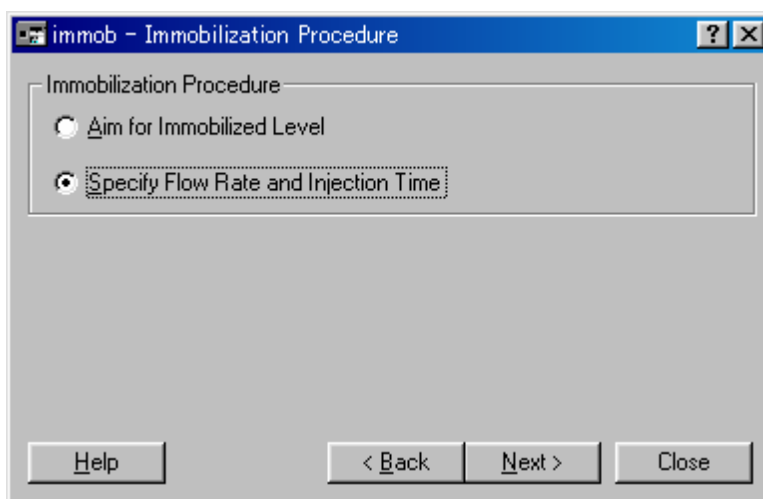
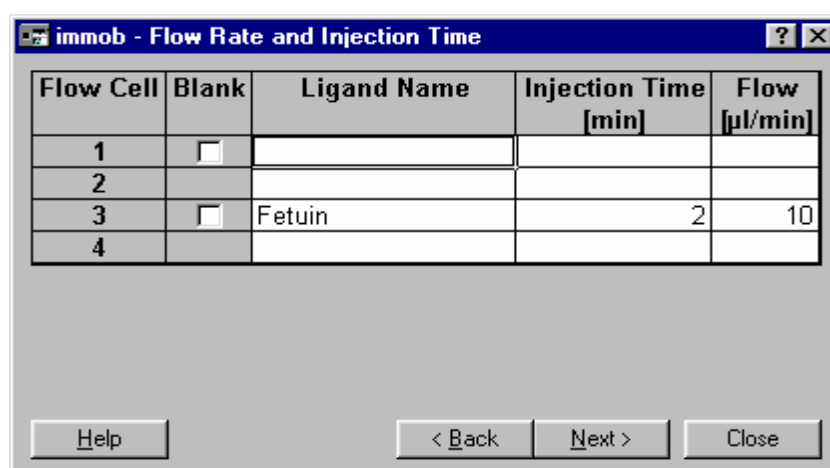
この場合には、希釈緩衝液の **pH** を下げるか、リガンド濃度を上げて、プレコンセントレーション効果を上げて再度固定化し直す。

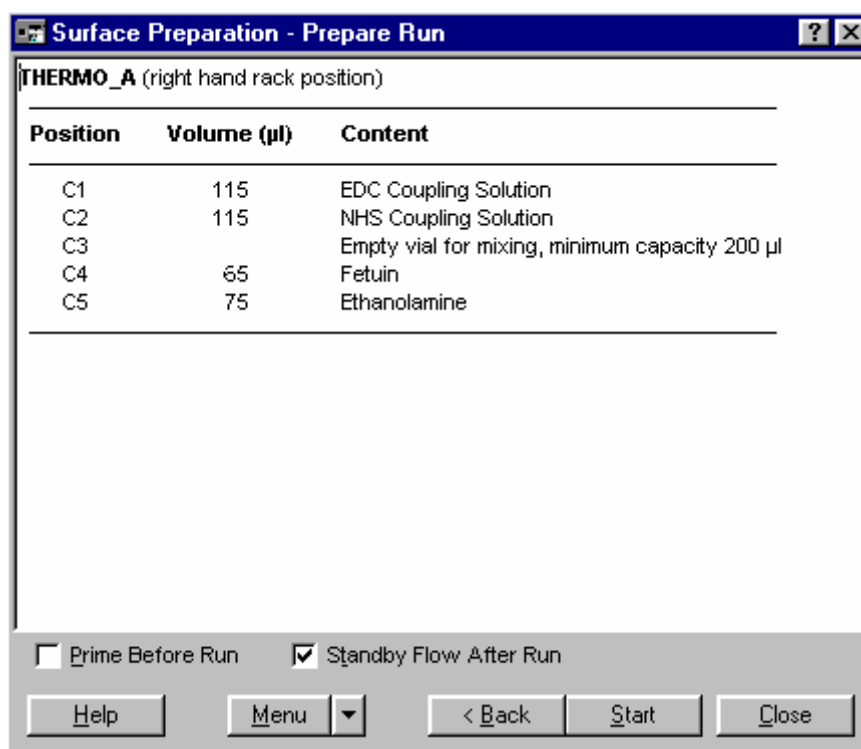
② プレコンセントレーション効果が強すぎる場合

テスト添加においてプレコンセントレーション効果が強すぎて、添加時間を短くしても目標のレベル以上に固定化されてしまうと判断される場合は上のようなメッセージが表示され、固定化操作が中断される。

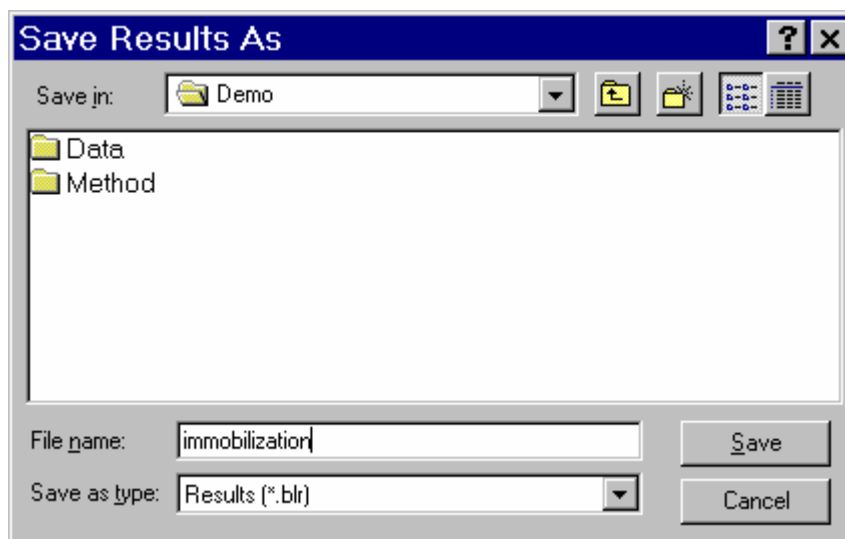
この場合には、希釈緩衝液の **pH** を上げるか、リガンド濃度を下げて、プレコンセントレーション効果を下げて再度固定化し直す。

9-2-2. リガンド添加時の流速と添加時間を指定した固定化（Specify Flow Rate and Injection Time）

リガンドの添加の際の流速および添加時間だけを設定して、固定化を行うwizard。決められた固定化条件を繰り返す場合に便利である。

実験条件	流速	時間
NHS 活性化	**5 μl/min**	**7** 分間
リガンドのカップリング	自由に設定	自由に設定
エタノールアミンによるブロッキング	**5 μl/min**	**7** 分間

Specify Flow Rate and Injection Time を選択し、**Next**>をクリックする。

使用するフローセルに固定化するリガンドの名前を入力し、リガンド添加時間および流速を設定し、**Next**>をクリックする。

指示どおりにセット後、**Next**＞をクリックする。（必要に応じて位置を変更する。）

位置および容量を再確認し、Standby Flow After Run にチェックを入れる。必要があれば Prime Before Run にチェックを入れる。**Start** をクリックする。

↓

保存先のフォルダーを指定し、ファイル名を入力し、**Save** をクリックする。

固定化が開始される。

↓

実験が終了すると、以下のように結果が表示される。

Fc	APROG	Time	Window	AbsResp	SD	Slope	LRSD	Quality	Baseline	RelResp	Id	Blank	InjectTime	LigandName
3	FlowAndTime	286.5	5.0	12200.8	0.11	-0.04	0.08	Ok	Yes	0	Baseline	No	2	Fetuin
3	FlowAndTime	839.5	5.0	12312.9	0.16	-0.07	0.09	Ok	No	112.1	EDC/NHS	No	2	Fetuin
3	FlowAndTime	1088.5	5.0	15533.7	1.17	-0.47	0.86	Ok	No	3333.0	Ligand	No	2	Fetuin
3	FlowAndTime	1638.5	5.0	15417.6	0.18	-0.07	0.13	Ok	No	3216.8	Ethanolamine	No	2	Fetuin

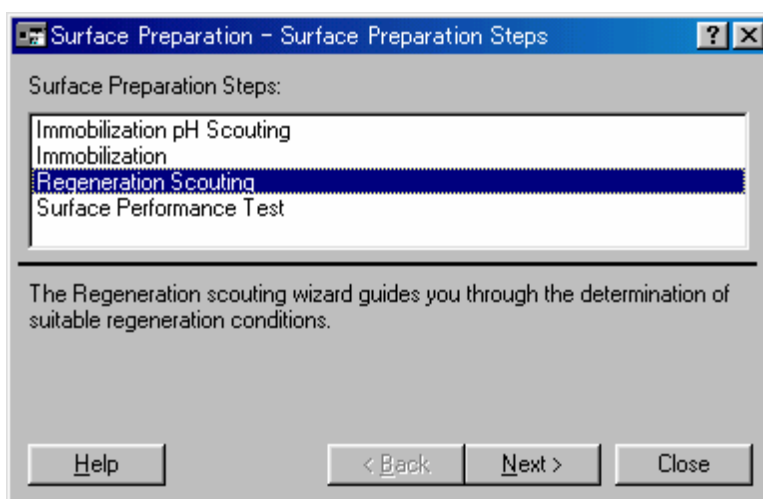
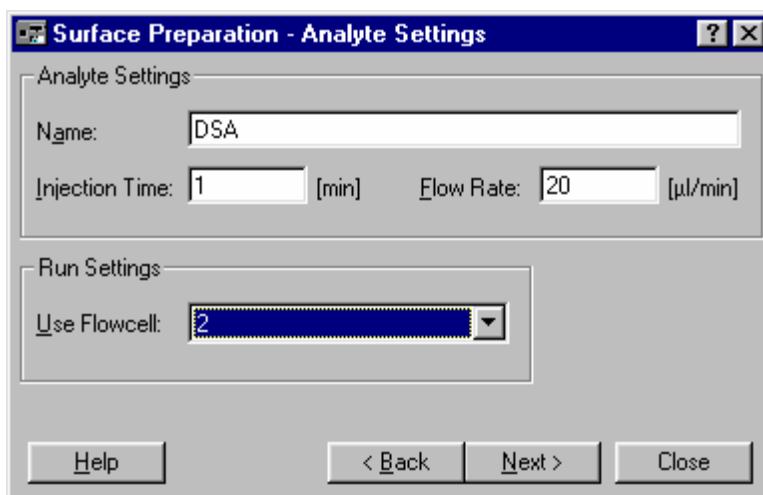
Fc	Ligand	Response 1 (bound)	Response 2 (final)	Procedure
3	Fetuin	3220.8	3216.8	Injection time 2.0 min, flow 10 µl/min

Response 1 および 2 についての解説は 99 ページ参照のこと。

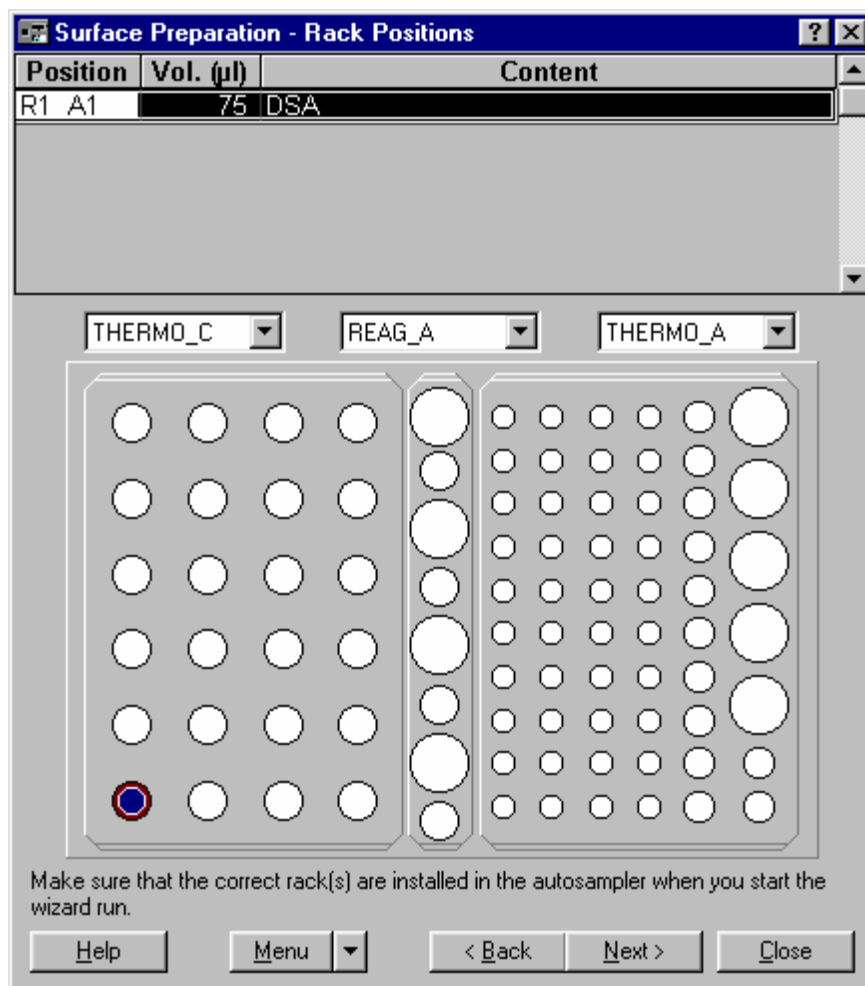
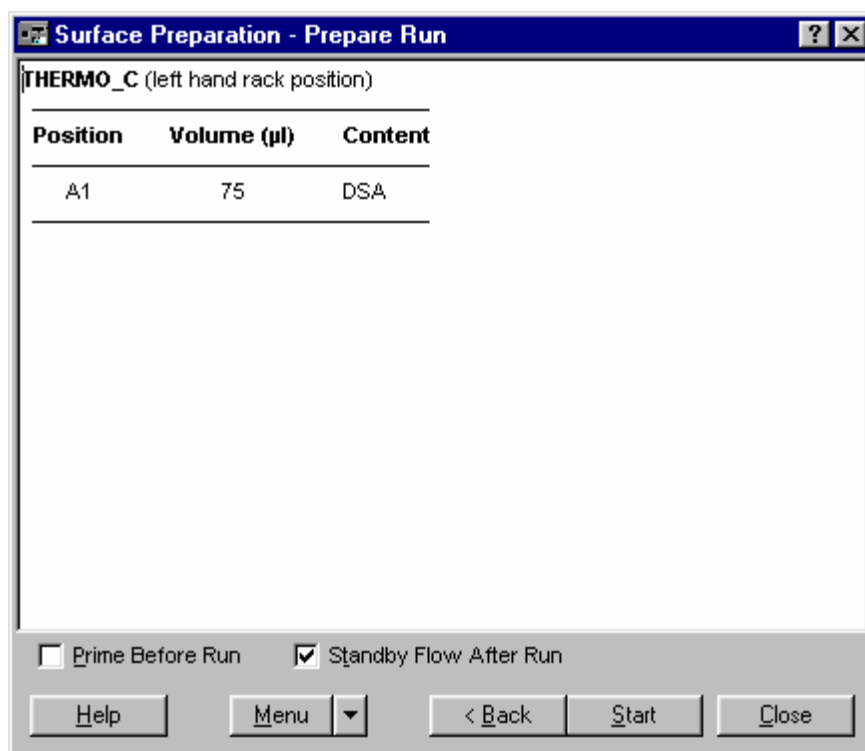
9-3. 再生条件の検討 (Regeneration Scouting)

固定化終了後、アナライトの再生条件を検討する wizard である。

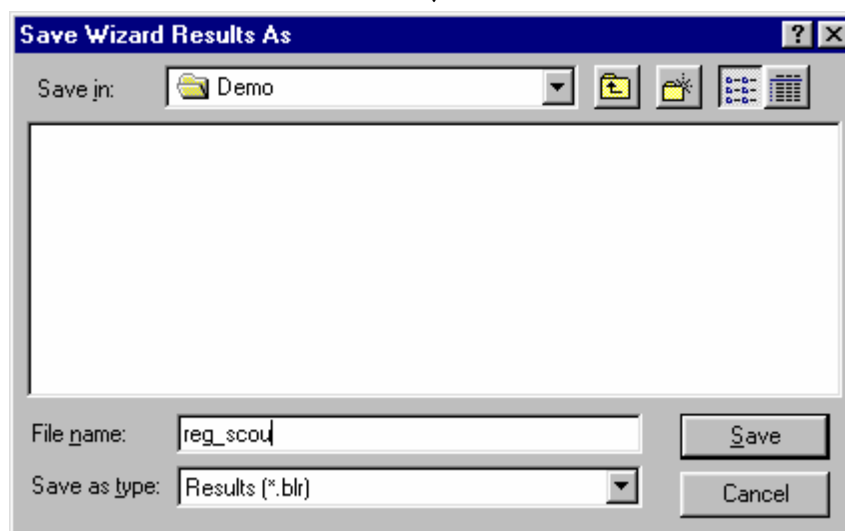
理想的な再生条件は以下である。
① 結合したアナライトが完全に解離すること。
② 固定化したリガンドが失活しないこと。
③ リガンドがデキストランから脱落しないこと。

Run → **Run Application Wizard...** → **Surface Preparation** を選択し、**Start...**をクリックする。

Regeneration Scouting を選択し、**Next**＞をクリックする。

アナライトの名前、添加時間（2～5mim 程度）、および流速（10～20μl/min 程度）を入力し、使用するフローセル（リガンドを固定化しているセル）を選択する。

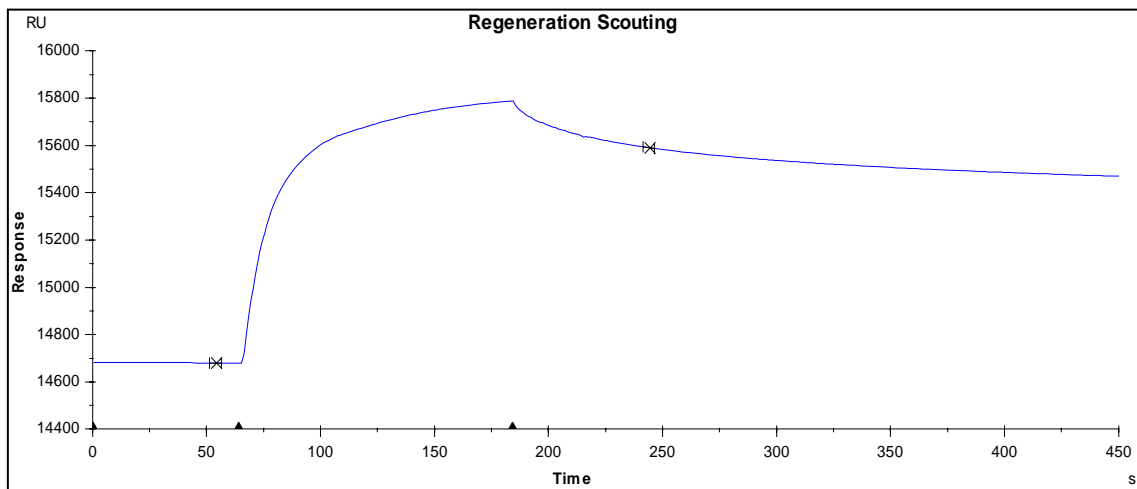
Next＞をクリックする。

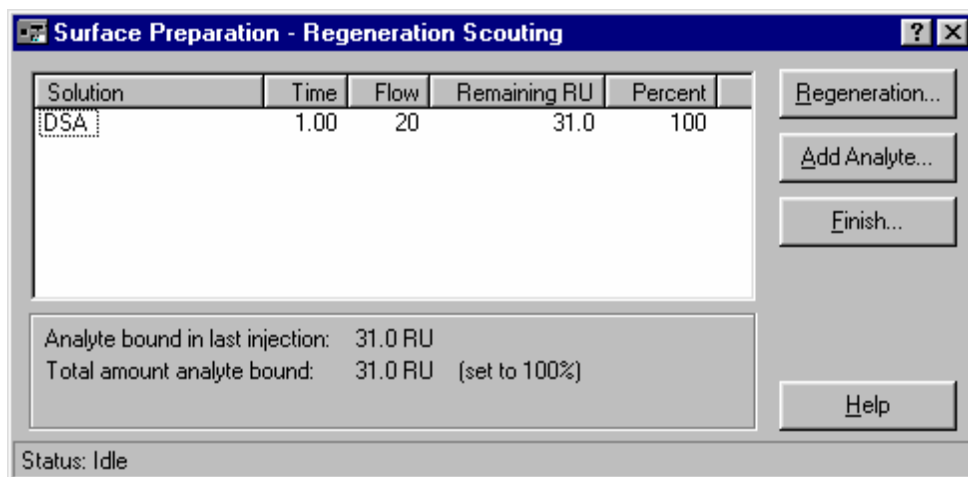
↓

アナライトをセットし、**Next**＞をクリックする。

↓

位置および容量を再確認し、Standby Flow After Run にチェックを入れる。必要があれば Prime Before Run にチェックを入れる。**Start** をクリックする。

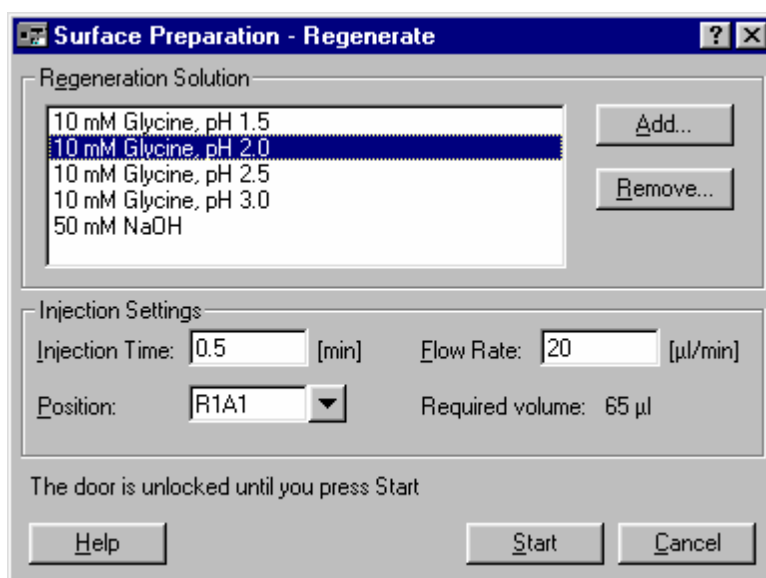
↓

保存先のフォルダーを開き、ファイル名を入力し、**Save** をクリックする。

実験が開始される。

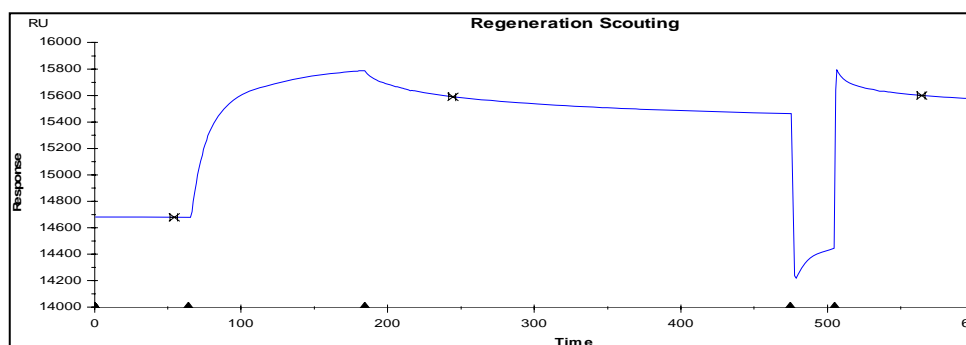
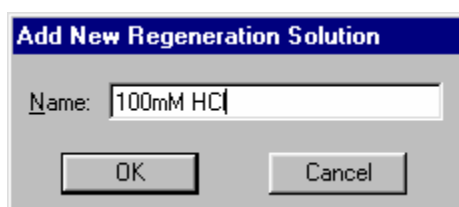
↓

センサーグラムがスタートし、アナライトが添加される。

↓

上のボックスが開いたら、**Regeneration...**をクリックする。

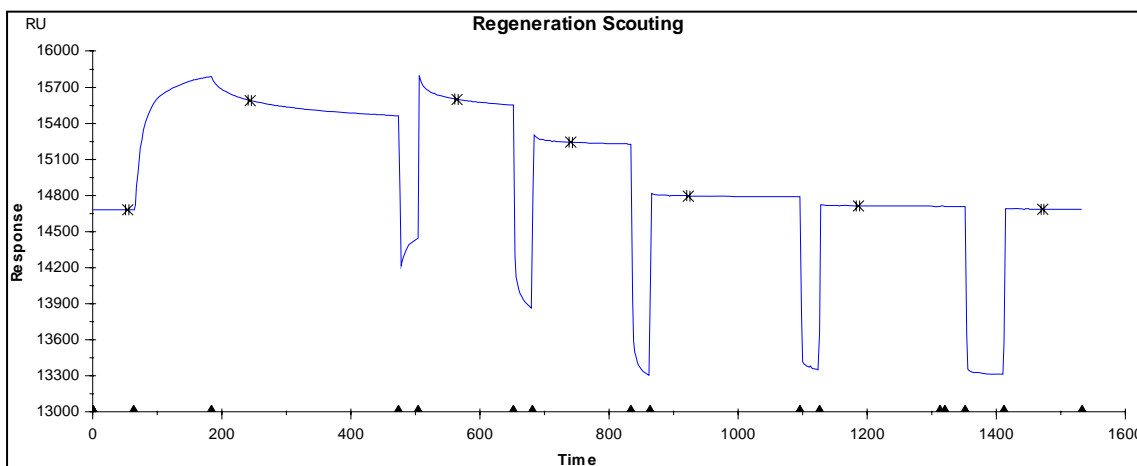
(アナライトの結合量が少ない場合には、**Add Analyte...**をクリックすると、アナライトを再度添加できる。)

↓

使用する再生溶液を選択し、添加時間、流速、バイアル位置を設定し、**Start** をクリックする。
再生溶液の 1 回の添加は 0.5～1 分間程度を推奨する。
また、流速は速いほうが再生効果を得やすいことが多く、20～60µl/min 程度がよく使われる。（再生溶液の種類については 42 ページ参照。

ボックスの中に、使用したい再生溶液がない場合には、**Add** をクリックして溶液名を入力し **OK** をクリックし、再生溶液を追加する。

↓

選択した再生溶液が添加される。

さらに、異なる再生溶液を試みる場合には、**Regeneration...**をクリックし、同様の操作を行う。アナライト添加開始前のベースライン付近まで解離する条件（再生溶液の種類、添加条件）を検索する。

↓

終了する場合には、Regeneration Scouting ボックスの **Finish...**をクリックする。

（結果の評価）

Reg_scau - Results

Cycle	Fc	Solution	Time [min]	Flow [µl/min]	AbsResp [RU]	Remaining [RU]	Analyte [%]
1	3	DSA(20ug/ml)	2.00	20	15591.2	911.3	100
1	3	10 mM Glycine, pH 3.0	0.50	20	15600.5	920.6	101
1	3	10 mM Glycine, pH 2.5	0.50	20	15242.5	562.5	62
1	3	10 mM Glycine, pH 2.0	0.50	20	14797.0	117.1	13
1	3	10 mM Glycine, pH 1.5	0.50	20	14715.1	35.2	4
1	3	10 mM Glycine, pH 1.5	1.00	20	14686.8	6.8	1

Close
Help
Print...
Regeneration

①再生効率が 20％よりも少ない（Analyte が 80％以上残る）場合には、再生溶液の条件を厳しくする。（pH 条件を厳しくする、イオン強度を上げる等）
②再生効率が 20～80％の間（Analyte が 80～20％残る）場合には、繰り返し同じ再生溶液を 2 回添加してみる。
③最初の添加で、再生効率が 90％もしくはそれ以上の場合（＝ほとんど再生される場合）には、その条件を採用する。

9-4. リガンドの安定性試験 (Surface Performance Test)

決定した再生条件で、リガンドの安定性を試験する wizard。ここでは、次のような項目を確認し評価する。

1. 同一濃度のアナライトの結合量が、各サイクルで変化がないか（リガンドの失活は起きていないか）。
2. ベースラインが各サイクルで変化しないか。

Run → **Run Application Wizard…** → **Surface Preparation** を選択し、**Start…**をクリックする。

Surface Performance Test を選択し、**Next**＞をクリックする。

↓

アナライト名を入力し、添加時間（分）、流速（µl/min）、繰り返し測定回数（5回以上）、および使用フローセルを指定し、**Next**＞をクリックする。

↓

再生条件を入力し、**Next**＞をクリックする。

（注意）
再生溶液の添加条件は以下の 3 つのうちから選ぶことができる。

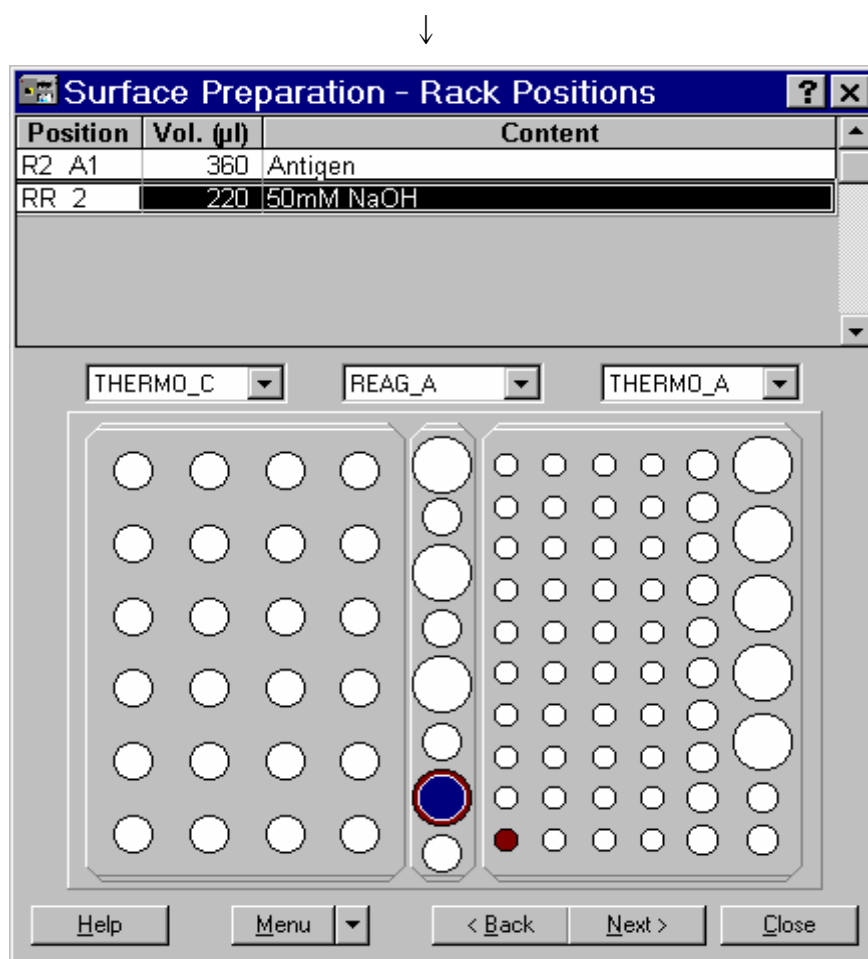
Dissociation in Buffer

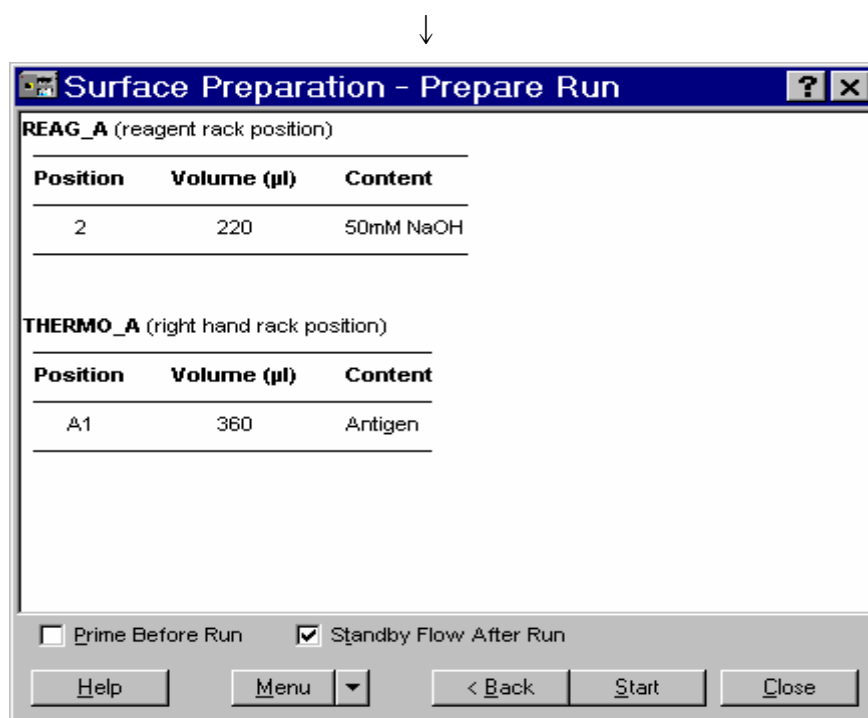
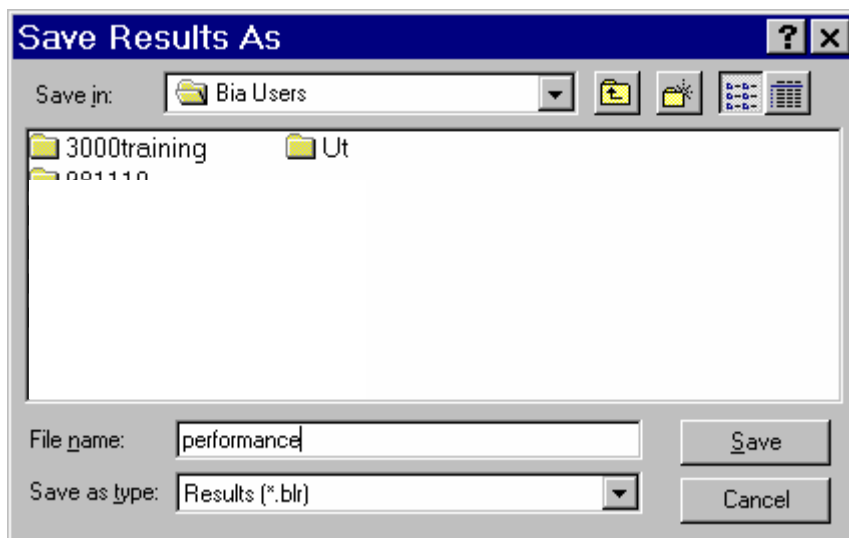
ランニング緩衝液のみを流してアナライトを解離させる。
（解離速度が非常に速いアナライトのみに使用）

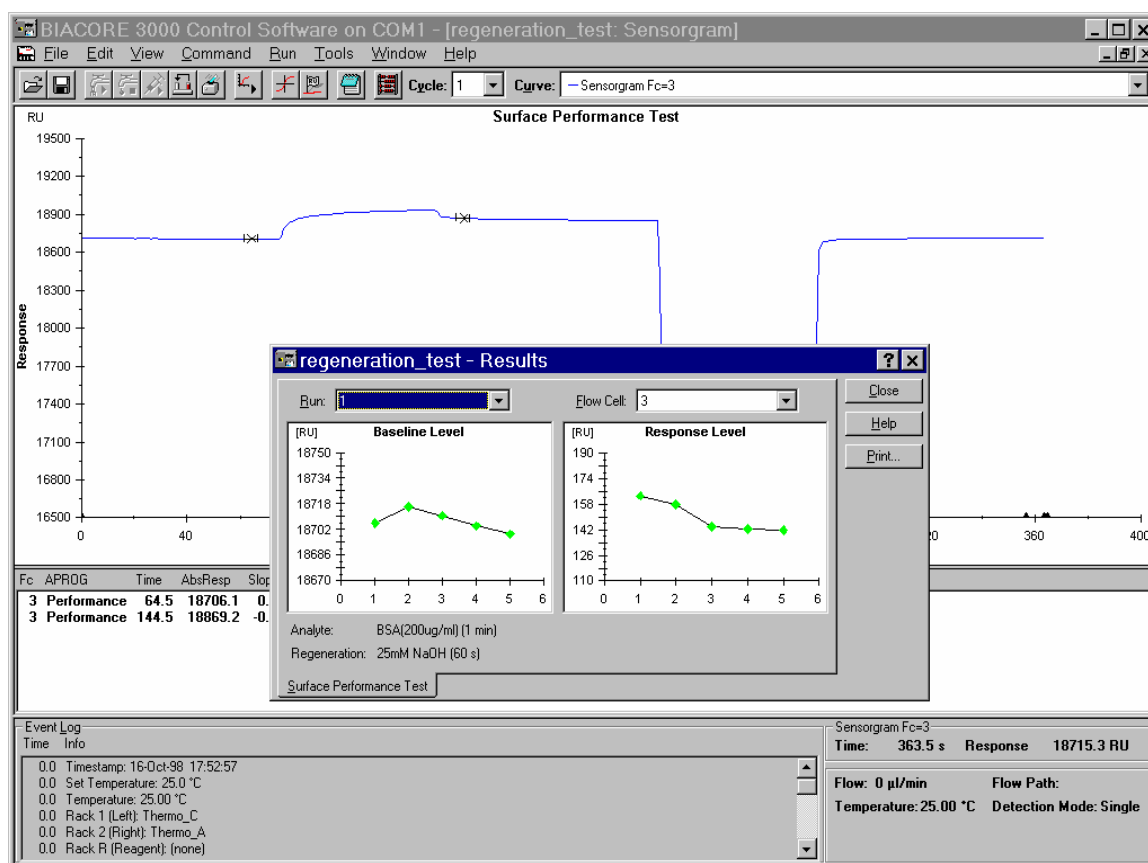
Single Injection

再生溶液を 1 回添加する。
（最も一般的な方法）

Two Injections

再生溶液を 2 回もしくは 2 種類添加する。

↓

サンプル、試薬をセットし、**Next>**をクリックする。

サンプルの位置および容量を再確認し、Standby Flow After Run にチェックを入れる。必要があれば Prime Before Run にチェックを入れる。**Start** をクリックする。

保存先のフォルダーを指定し、ファイル名を入力し、**Save** をクリックする。
再生条件の検討を開始する。

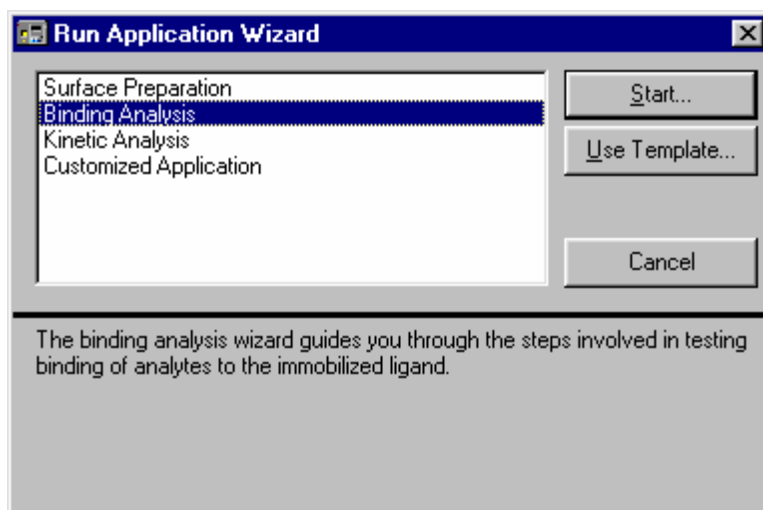
↓

(再生条件の評価)
Baseline Level および **Response Level** が表示される。
Baseline Level は各サイクルのベースラインレベルの変化、Response Level は各サイクルの同一濃度のアナライトの結合量の変化を表している。
サイクル毎にはっきりとした傾向がなく、変動の幅が小さい場合は非常に良好な結果である。
しかし、ベースラインが上昇して行く傾向がある時は、一般的に再生が不充分でアナライトが蓄積していることが考えられる。レスポンスの変動がなく一定の場合には、ベースラインが幾分か減少しても良い。しかしベースラインの減少とともにレスポンスの減少が見られる場合は、再生操作中にリガンドがセンサーチップから外れている可能性が考えられるので、よりマイルドな再生条件を再検討する必要がある。
また、ベースラインの変動がなく、レスポンスが減少している時は、再生によりリガンドの活性が低下していることが考えられるので、この場合も再生条件の再検討が必要である。

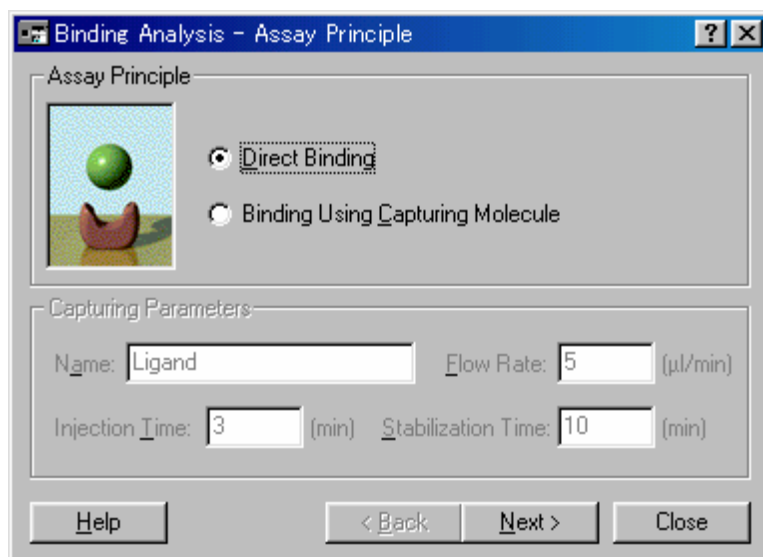
① **Baseline Level** 低下および **Response Level** 低下の場合
再生によりリガンドが遊離していることが考えられる。
② **Baseline Level** 不変および **Response Level** 低下の場合
再生によりリガンドが失活していることが考えられる。
③ **Baseline Level** 上昇および **Response Level** 低下の場合
再生によってもアナライトが完全に遊離していないことが考えられる。

9-5. スクリーニング(Binding analysis)

各種アナライトの結合の有無を調べる場合に使用する wizard。スクリーニングやエピトープマッピング等に使用する。

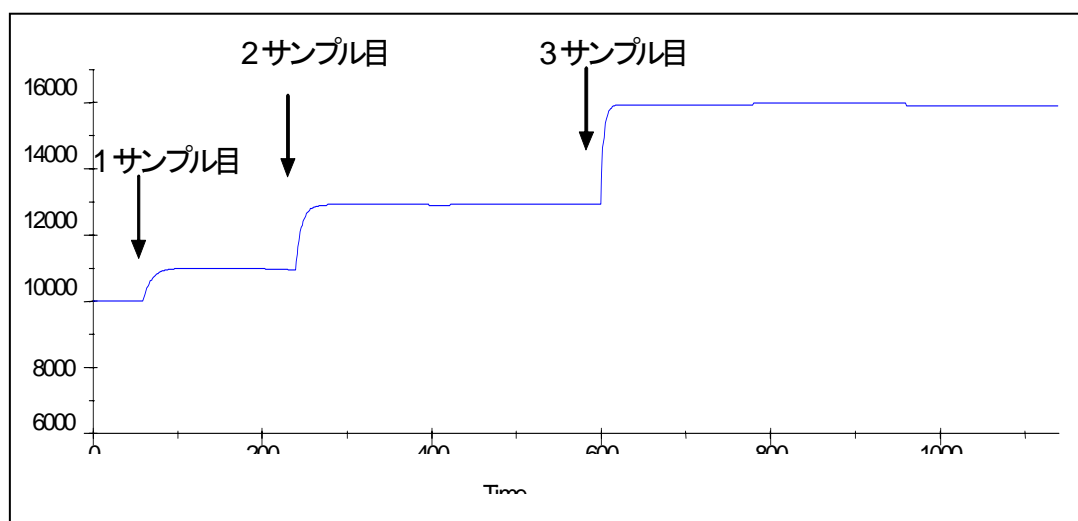
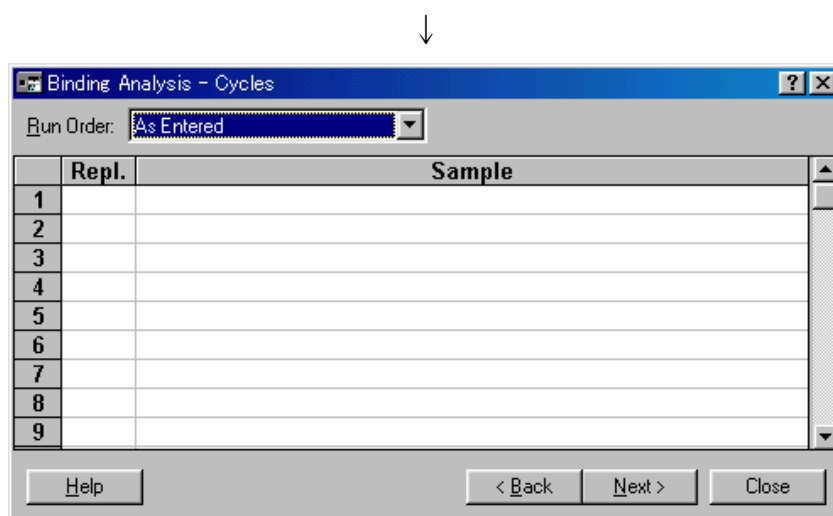
Run → **Application Wizard...**をクリックする。

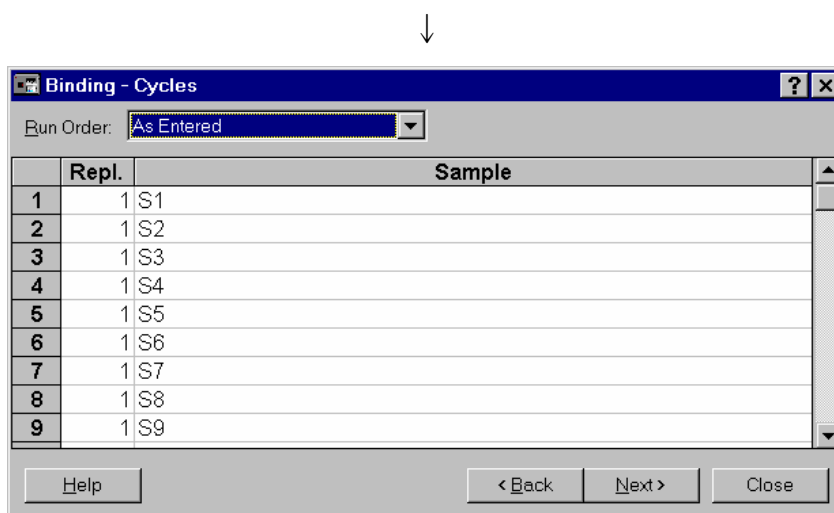
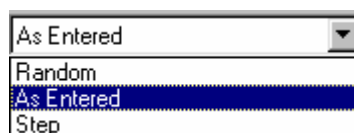
↓

Binding Analysis を選択し、**Start...**をクリックする。

↓

Direct Binding を選択し、**Next>**をクリックする。
(キャプチャー法によりリガンドをトラップした後、アナライトを添加する場合は、**Binding Using Capturing Molecule** を選択する。)

使用するフローセル（リガンド固定化セルからリファレンスセルを差し引きする設定が望ましい。）、流速（10～20µl/min 程度）、アナライト添加回数（同一サイクル内の各種サンプルの添加回数）および添加時間（0.5～3 分）を入力し、**Next＞**をクリックする。**Wait After Injection:** は、アナライト添加終了後の解離時間（分）の設定であり、通常 2.5 分。

エピトープマッピング等、多段階の反応を見る場合には、Number of Sample Injections:の数字を増加させる。最大 4 サンプルまでの添加が可能である。

↓

Sample にアナライト名を **Repl.** に同一アナライトの繰り返し測定回数を入力する。

↓

Run Order:に測定順序を選択する。

Random :入力したサンプルをランダムに測定。

As Entered　:入力した順番で測定（複数。繰り返し測定を指定している場合、同じサンプルについては連続して測れる。）。

Step　:複数の繰り返し測定を指定している場合、全ファイルにおいて、一連の測定終了後、二連目を測定。

Next>をクリックする。

↓

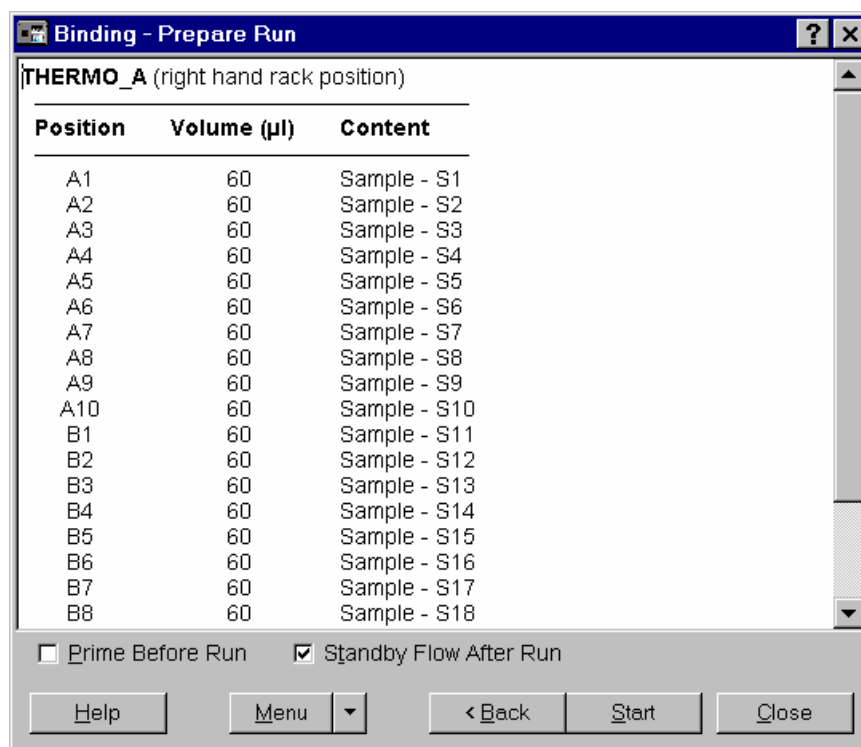
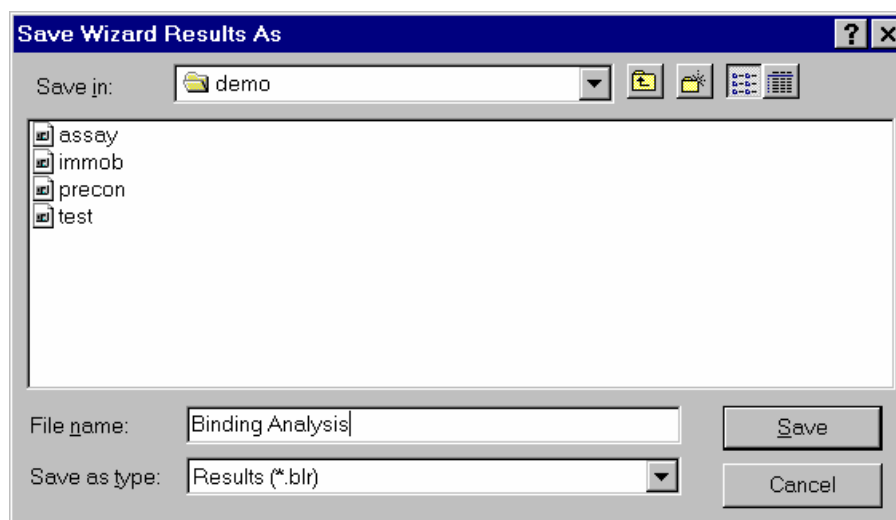
再生条件を設定し（105 ページ参照）、**Next>**をクリックする。

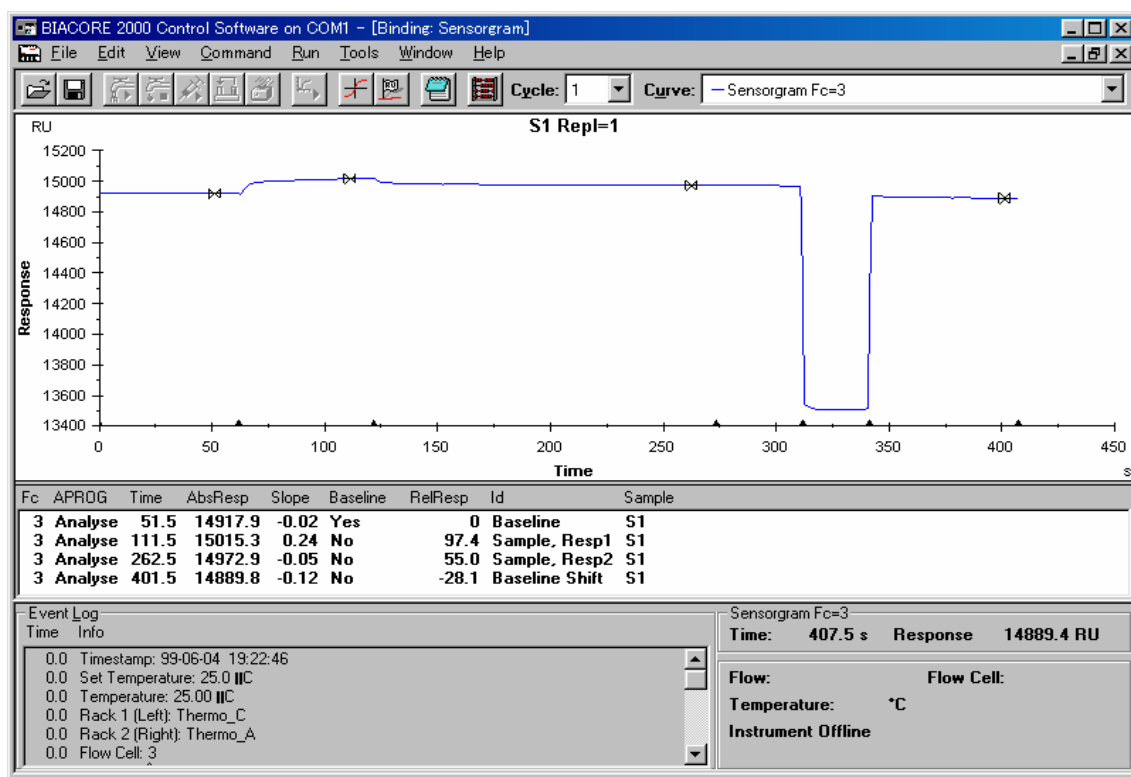
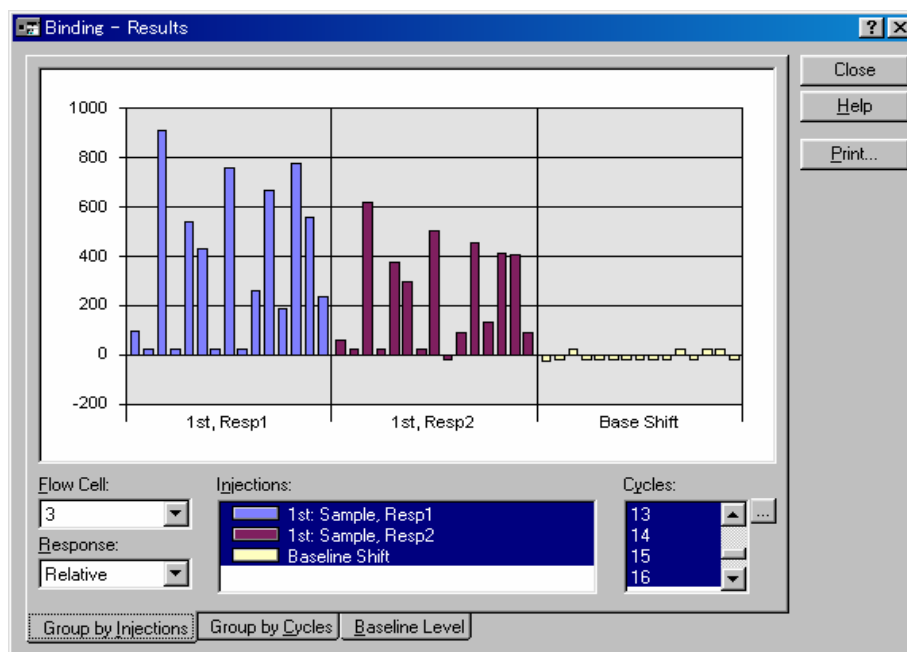
↓

サンプル、試薬をセットし、**Next**＞をクリックする。

↓

サンプルの位置および容量を再確認し、Standby Flow After Run にチェックを入れる。必要があれば Prime Before Run にチェックを入れる。**Start** をクリックする。

↓

保存先のフォルダーを指定し、ファイル名を入力後、**Save** をクリックする。プログラムが動き出す。

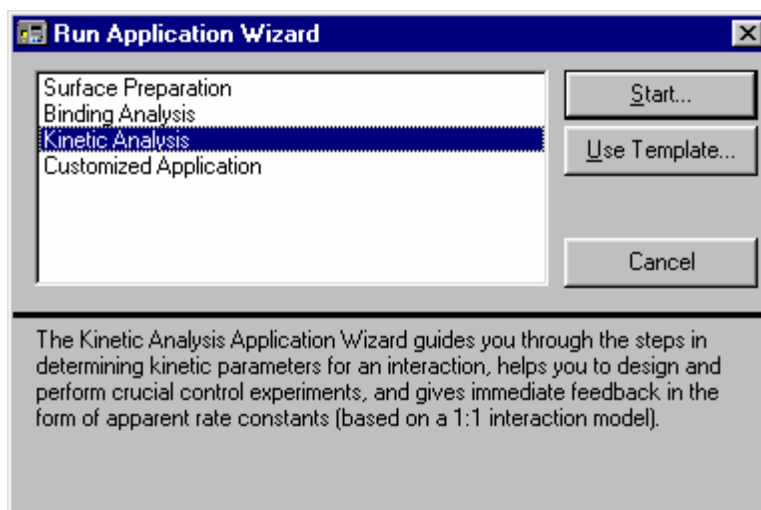
(実験結果の表示)
実験が終了すると、以下のような実験結果が表示される。

各種アナライトの結合量のグラフが同時に表示される。

Resp1 は、アナライト添加終了直前のレスポンス、Resp2 はサンプル添加後（再生溶液添加前）のレスポンスである。

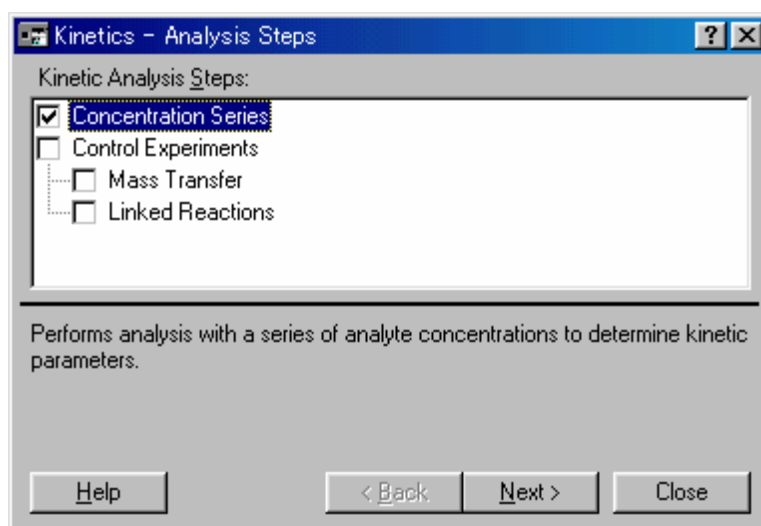
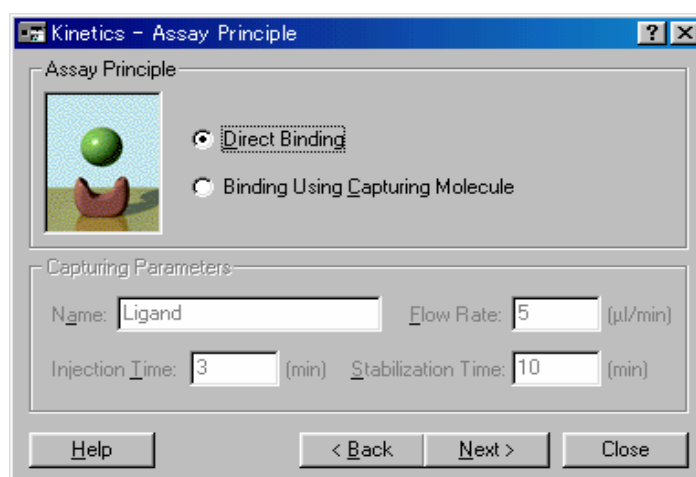
9-6. 解離定数・反応速度定数の算出 (Kinetic analysis)

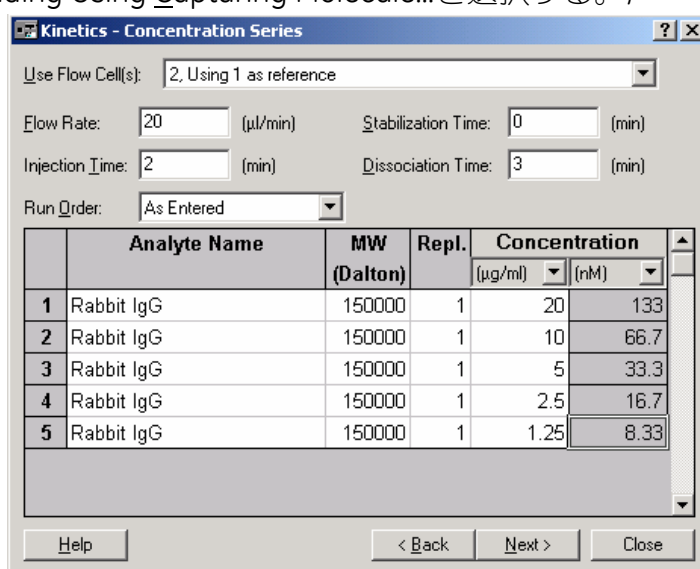
9-6-1. 解離定数・反応速度定数の算出(Concentration series)

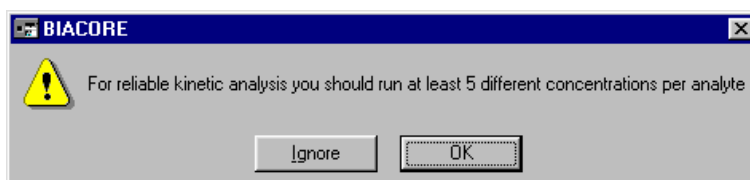
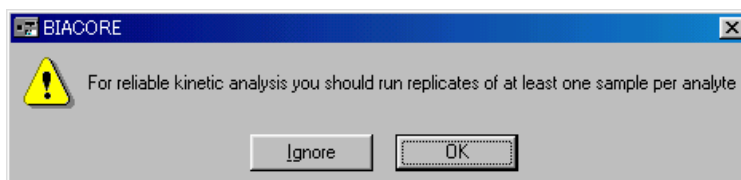
結合速度定数(k_a)あるいは解離速度定数（k_d）を算出するための wizard。

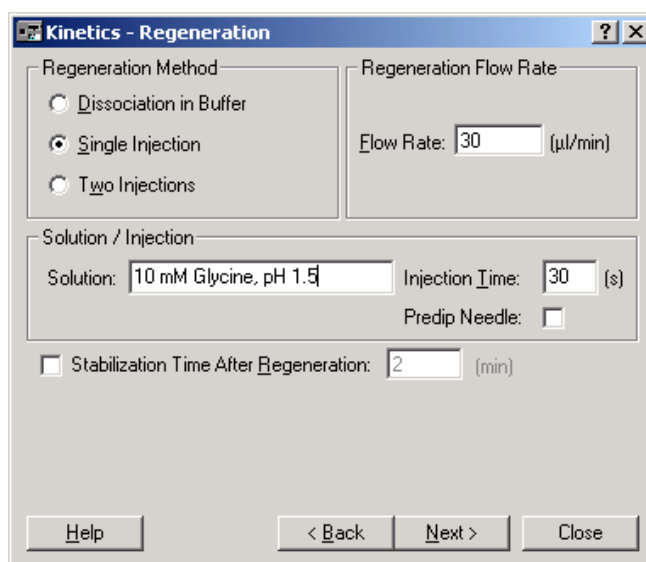
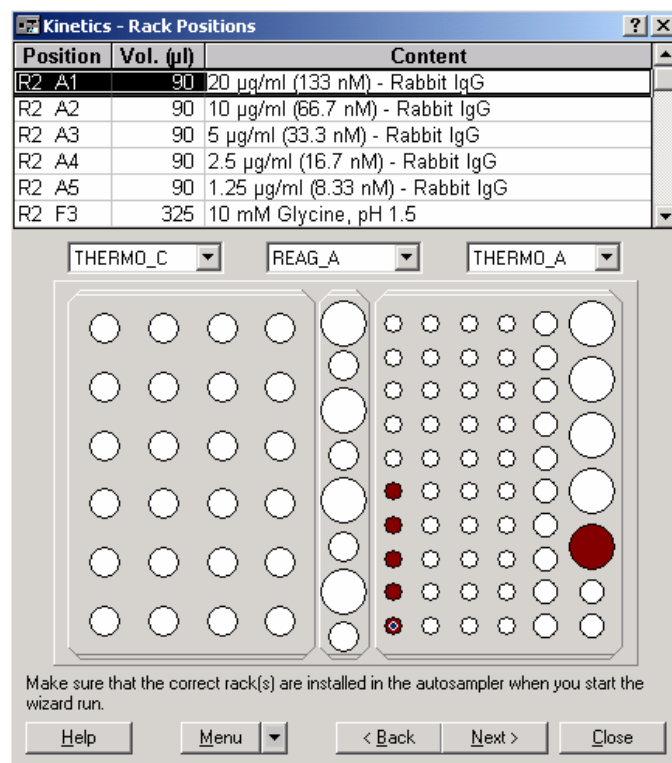
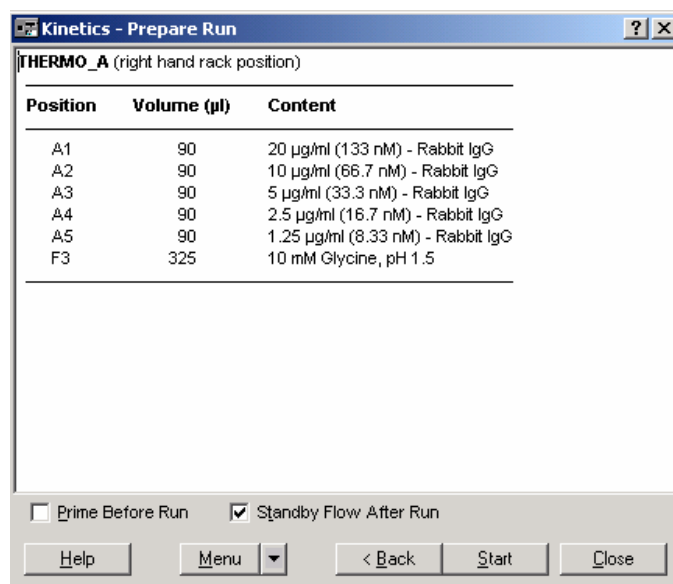
Run → **Run Application Wizard...**をクリックする。

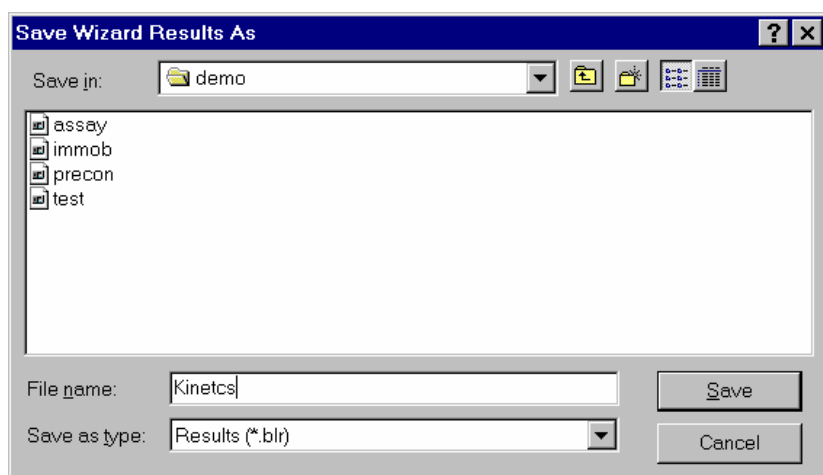
↓

Kinetic Analysis を選択し、**Start...**をクリックする。

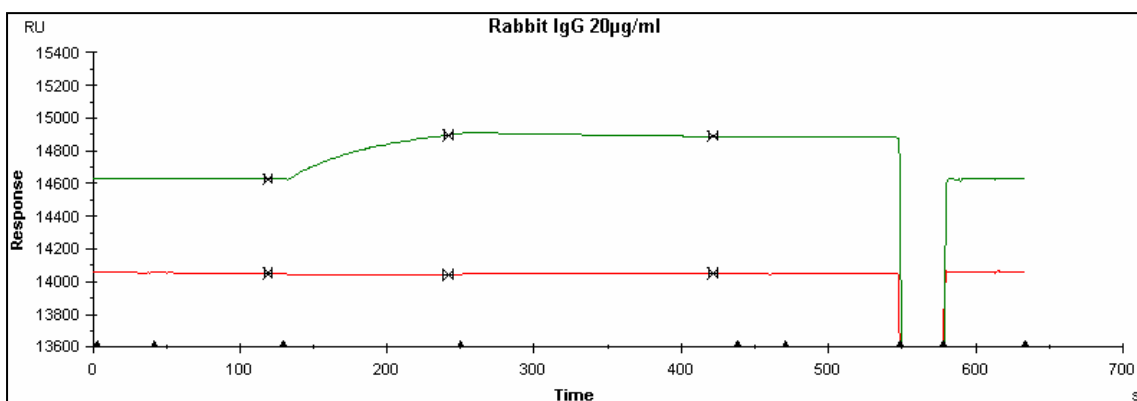
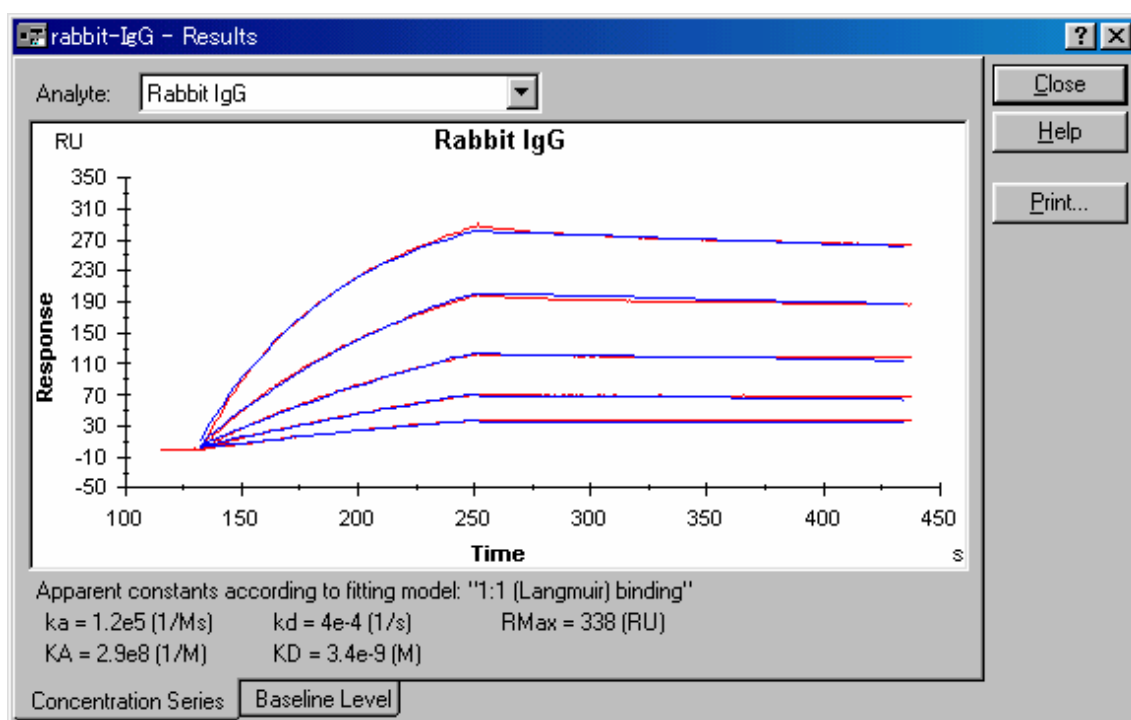
↓

Concentration Series を選択し、**Next**＞をクリックする。

Direct Binding もしくは Binding Using Capturing Molecule を選択する。
ここでは Direct Binding を選択し、Next>をクリックする。
(キャプチャー法によりリガンドをトラップした後、アナライトを添加し測定する場合は、Binding Using Capturing Molecule...を選択する。)

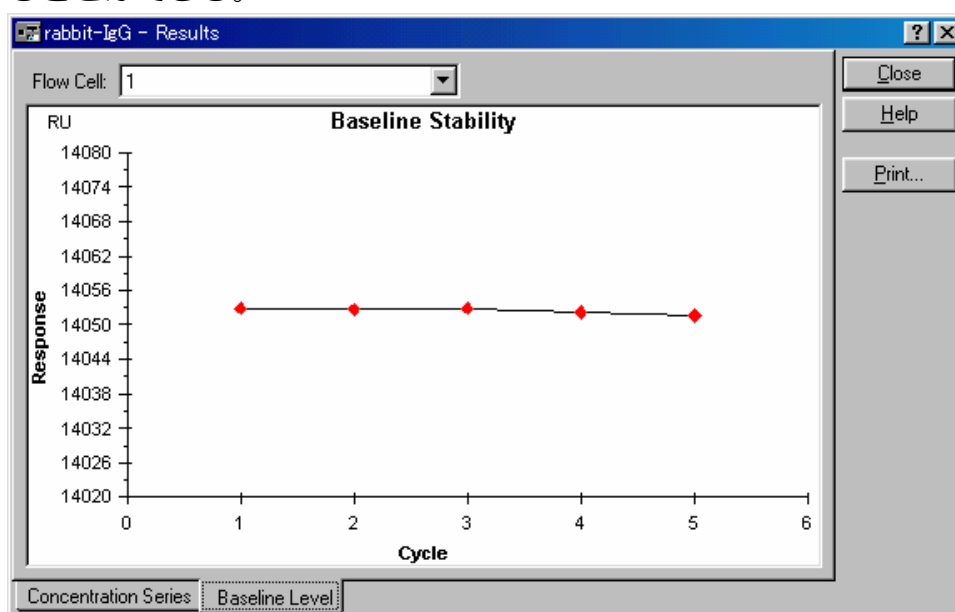
	Analyte Name	MW (Dalton)	Repl.	Concentration (µg/ml)	(nM)
1	Rabbit IgG	150000	1	20	133
2	Rabbit IgG	150000	1	10	66.7
3	Rabbit IgG	150000	1	5	33.3
4	Rabbit IgG	150000	1	2.5	16.7
5	Rabbit IgG	150000	1	1.25	8.33

使用するフローセル、流速（20µl/min 以上）、添加時間（2～3 分程度）、解離時間（2～3 分程度）を入力する。さらに、Stabilization Time はアナライト添加前のベースラインの安定化時間である。ベースラインのドリフトが激しい場合は任意に設定する。
アナライト名、アナライトの分子量、アナライトの繰り返し測定回数、濃度を入力する。下のテーブルには、アナライト濃度は 5 段階以上、少なくとも 1 濃度については繰り返し測定し（n=2)、濃度 0 のアナライトについても測定することを推奨する。カラムを選択した状態で、Enter を繰り返し押すと、サンプル数を増やすことができる。
Next>をクリックする。

（注意）
Next クリック後、次のメッセージが出てくる場合がある。

これは、アナライトの濃度を 5 段階以上で行うことを奨めるものである。必要がない場合には、Ignore をクリックする。

これは、アナライトの同一濃度のサンプルを複数回繰り返し測定することを奨めるものである。必要がない場合には、Ignore をクリックする。

↓

再生条件を設定し、Next>をクリックする。

サンプル、試薬をセットし Next＞をクリックする。

↓

位置および容量を再確認し、Standby Flow After Run にチェックを入れる。必要があれば Prime Before Run にチェックを入れる。**Start** をクリックする。

保存先のフォルダーを指定後、ファイル名を入力し、**Save** をクリックすると、プログラムが動き始める。

(実験結果の表示)
実験が終了すると、以下のような実験結果が表示される。

同時に、得られたセンサーグラムを、1：1 binding model でフィッティングし、おおよその各種反応速度定数が計算される（次ページ）。

k_a：結合速度定数（1/Ms）、k_d：解離速度定数（1/s）、K_A：親和定数（1/M）
K_D：解離定数（M）、Rmax：アナライトの最大結合量（RU）
1：1 binding model 以外の反応モデルで解析したい場合は、BIAevaluation ソフトウェア（解析ソフトウェア）でファイルを開くこともできる。

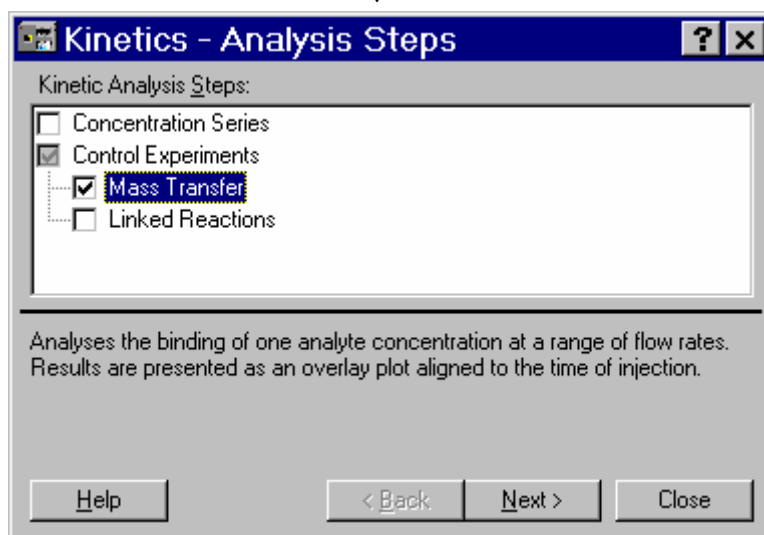
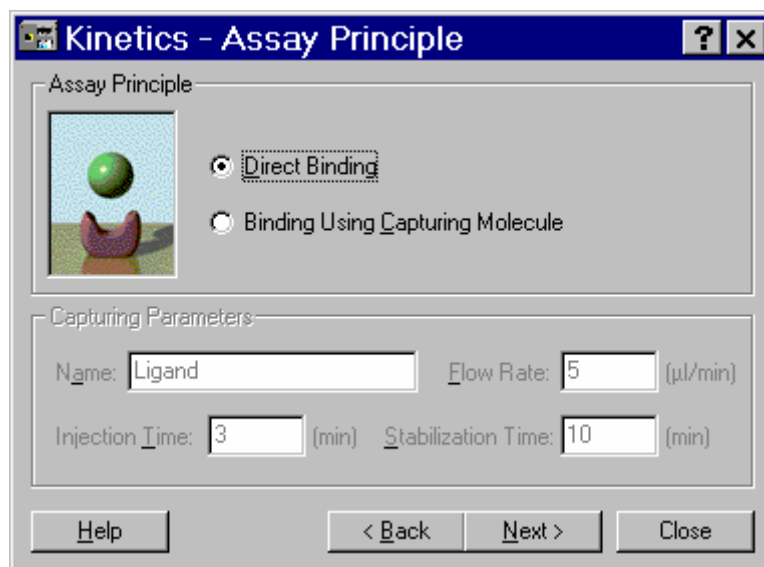
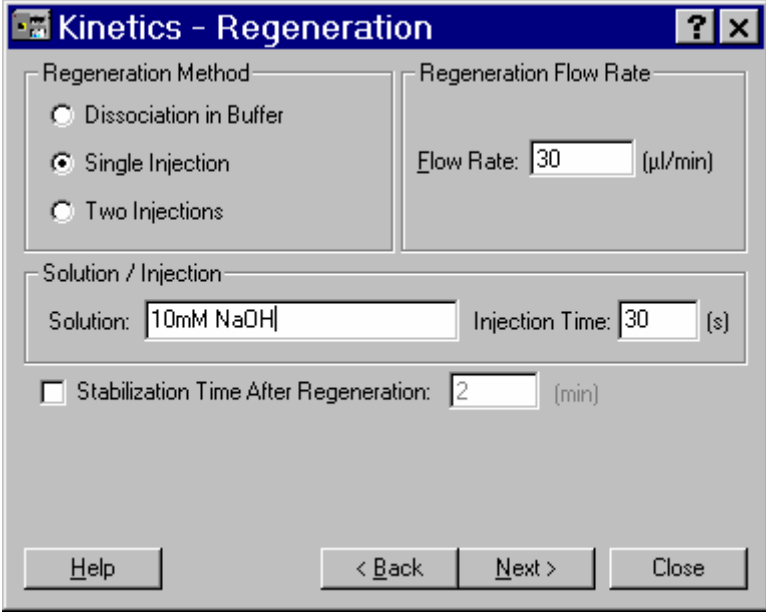
表中の **Baseline Level** をクリックすると各サンプルのベースラインの変動を表示することができる。

9-6-2. 実験条件の評価　(Control experiments)

9-6-2-1. 反応速度定数算出する上での実験系の評価(Mass transfer)

現在の実験系に、マストランスポートリミテーションの影響が現れているか調べるための wizard。

> マストランスポートリミテーションとは、リガンドの固定化量が多すぎるときに発生する現象である。結合領域において、センサー表面デキストラン内のアナライトの濃度が低くなり、また、解離領域においては、一度解離したアナライトが、さらにリガンドに再結合する（rebinding）。そのような環境下で取得したセンサーグラムからは、真の反応速度定数の算出はできない。
> この wizard では、同一アナライトを同一濃度で、流速を変化させて添加し、結合量の違いを評価する。マストランスポートリミテーション下では、流速毎にレスポンス（結合量）に変化が生じる。この場合には、固定化量を減少させて実験をやり直すか、BIAevaluation での解析の際に、1:1(Langmuir) with mass transfer をモデル選択する必要がある。

Run → **Run Application Wizard...**をクリックし、**Kinetic Analysis** を選択する。

↓

Mass Transfer を選択し、**Next**＞をクリックする。

Direct Binding を選択し、**Next**＞をクリックする。
(キャプチャー法によりリガンドをトラップ後、アナライトとの相互作用測定を行う場合は、Binding Using Capturing Molecule...を選択する。)

↓

使用するフローセル（リガンド固定化セルからリファレンスセルを差し引きする設定が望ましい。)、アナライト名等を入力し、**Next**＞をクリックする。

↓

再生条件を設定し、**Next**＞クリックする。

↓

サンプル、試薬をセットし、**Next**＞クリックする。

↓

サンプルの位置および容量を再確認し、Standby Flow After Run にチェックを入れる。必要があれば Prime Before Run にチェックを入れる。**Start** をクリックする。

↓

保存先のフォルダーを指定し、ファイル名を入力し、**Save** をクリックする。実験が開始される。

↓

上記のような実験結果が表示される。

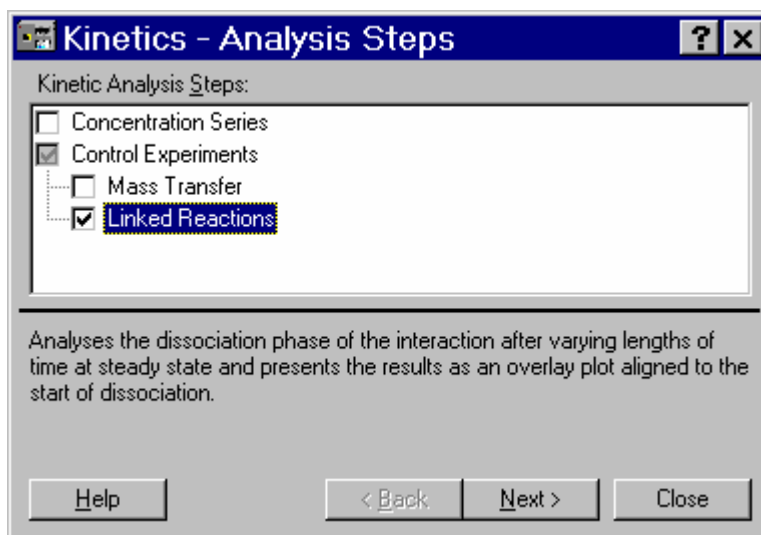
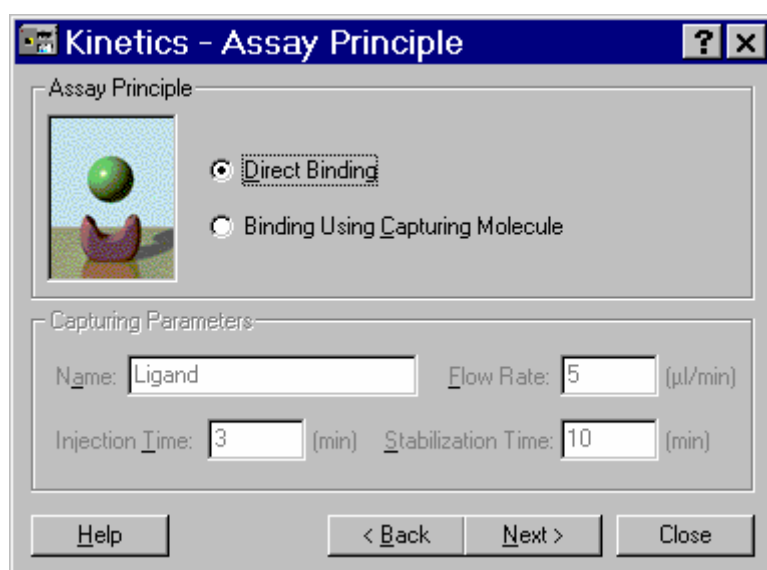
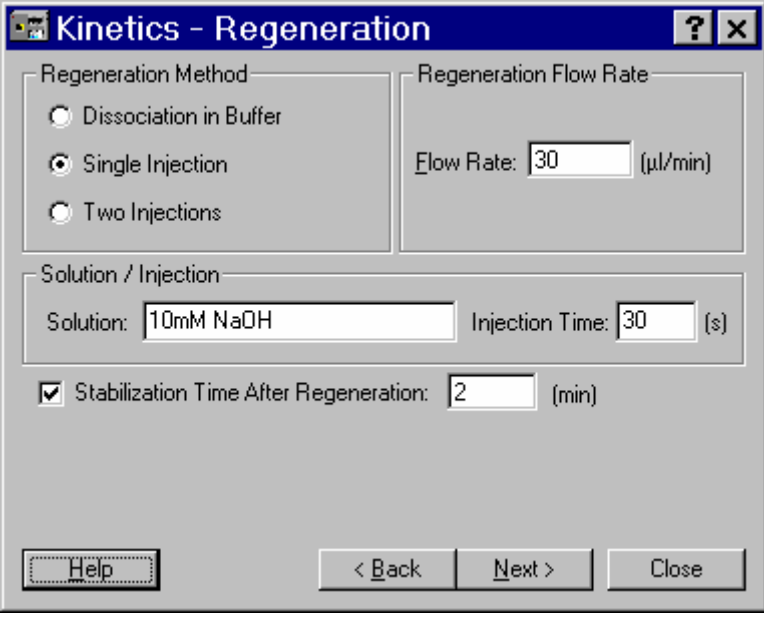
（実験結果の評価）
理想的な実験条件では、固定化したリガンドと添加したアナライトとの間の相互作用（結合および解離両速度）に、流速は全く影響しない。
しかし、マストランスポートリミテーション条件下では、相互作用反応は流速によって大きく変化する。表示された重ね書きのセンサーグラムの結合量（レスポンス）に違いがあれば、マストランスポートリミテーション条件下である。この場合には、リガンドの固定化量を減少させて実験をやり直すか、BIAevaluation での解析の際に、**1:1(Langmuir) with mass transfer** モデルを選択する。

9-6-2-2. 結合様式の評価 (Linked Reaction)

リガンドとアナライトとの反応が、単純な 1:1 なのか、あるいはより複雑な反応様式なのかを検討する wizard。

この実験では、同一アナライトを同一濃度（平衡に達するに十分な濃度）で、添加時間を変化させて添加し、解離領域のセンサーグラムを評価する。
1:1 の反応の場合、アナライトの添加時間が変化しても、解離の仕方に変化はなく、複雑な反応系の場合、解離の仕方に変化が表れる。BIAevaluation での解析の際の参考にする。

Run □Run Application Wizard...をクリックし、**Kinetic Analysis** を選択する。

↓

Linked Reaction を選択し、**Next**＞をクリックする。

Direct Binding を選択し、**Next**>をクリックする。
（キャプチャー法によりリガンドをトラップ後、アナライトとの相互作用測定を行う場合には、Binding Using Capturing Molecule...を選択する。）

↓

使用するフローセル（リガンド固定化セルからリファレンスセルを差し引きする設定が望ましい。）、アナライト名等を入力し、**Next**>をクリックする。

↓

再生条件を入力し、**Next**>をクリックする。

↓

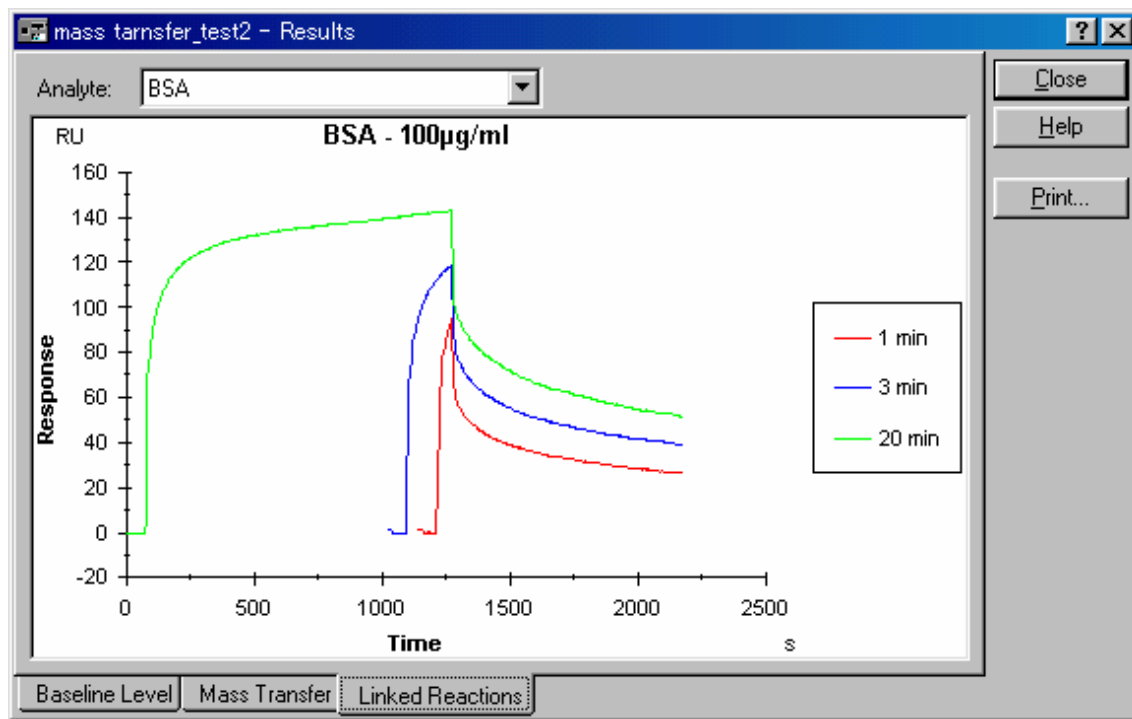
サンプル、試薬をセットし、**Next**>をクリックする。

↓

サンプルの位置および容量を再確認し、Standby Flow After Run にチェックを入れる。必要があれば Prime Before Run にチェックを入れる。**Start** をクリックする。

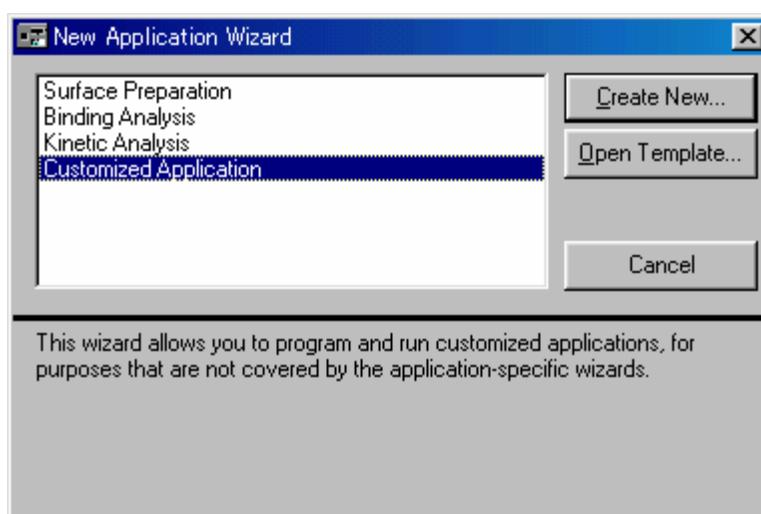
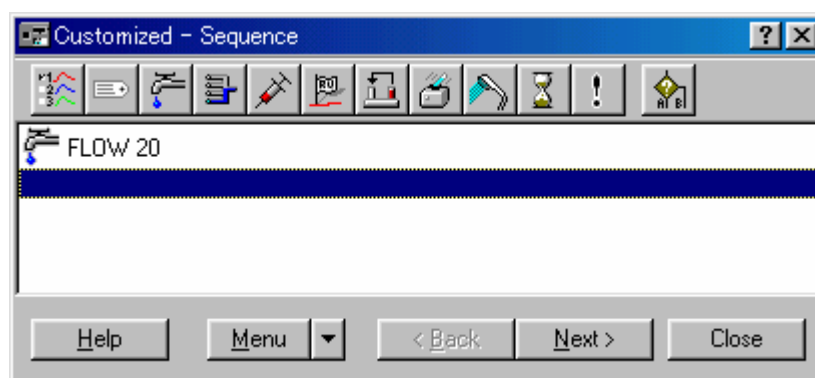
↓

保存先のフォルダーを指定して、ファイル名を入力し、**Save** をクリックする。実験が開始される。

↓

（実験結果の評価）
相互作用が単純な 1:1 の反応の場合、サンプルの添加時間に関係なく、解離の仕方は一定となる。解離に差がある場合には反応は 1：1 でなく、より複雑な反応系であることが考えられる。このような場合に 1:1 binding モデルで解析を行うと、本来の速度定数と異なる値が算出される可能性がある。

9-7.　複雑な実験プログラムの作成 (Customized Application)

サンプルの添加、再生溶液の添加、レポートポイントの作成等プログラムをで自由に組み立てるたるための wizard。各種操作コマンドのアイコンをクリックしていくだけで、簡単にプログラムを作成できる。

Run → **Run Application Wizard...**をクリックする。

Customer Application を指定し、**Creat New...**をクリックする。

上段のアイコンを使用し、実験系を組み立てていく。

9-7-1.　アイコンの説明

①		検出モード	検出セルおよび測定温度の設定コマンド。
②		キーワードの設定	レポートポイントテーブル中にサンプル名、濃度等の任意のコメントを表示させるコマンド。
③		流速の設定	流速の設定コマンド。
④		サンプル、試薬の添加	試料の添加コマンド。
⑤		レポートポイントの取得	センサーグラム上の任意の時点におけるレスポンスを取得し、レポートポイントテーブル上に表示させるコマンド。
⑥		サンプルの移動	試料をバイヤル間で移動させるコマンド。 試料の混合や希釈の目的に使用する。
⑦		サンプルの攪拌	バイヤル中の試料を攪拌するコマンド。通常は□のコマンドとセットで使用し、混合液の攪拌に用いる。。
⑧		流路の洗浄	ニードルや IFC をランニング緩衝液で洗浄するコマンド。
⑨		添加の待機	ランニング緩衝液を流した状態で次の操作事項を待機させるコマンド。秒単位で設定可能。
⑩		コメントの入力	プログラム画面中にコメントを入力するコマンド。操作に影響はない。
⑪		**If/Then 機能**	途中の実験結果から以降の操作を選択できるコマンド。例えば、一定量の結合量がない場合には、再生を行わずに、次のサイクルに移行する等。結合物質のスクリーニング等に有効である。

9-7-2. プログラムの作成

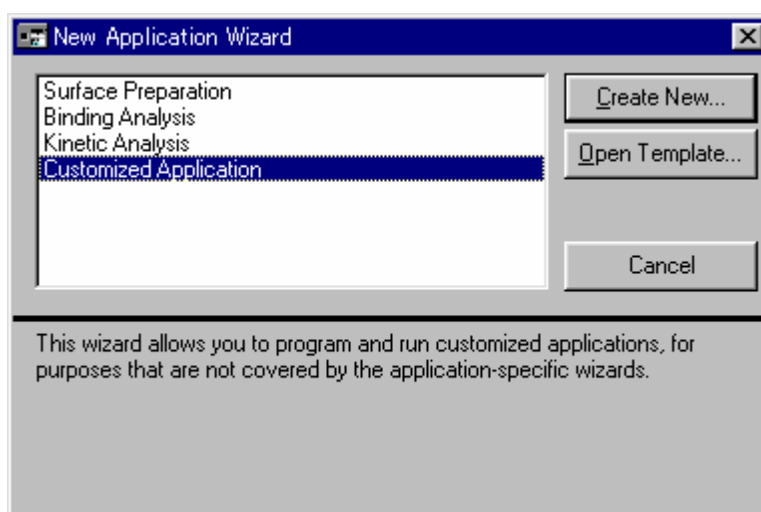
プログラムの作成方法を習得することを目的に、ステップを踏んで説明する。

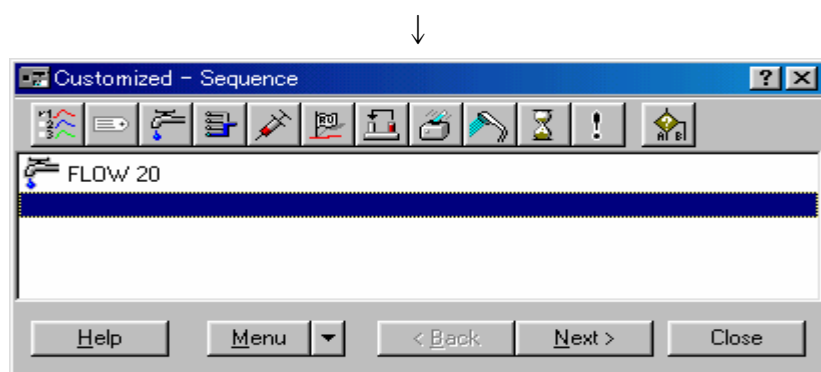
ステップ 1． **1** 個のアナライトについての分析

以下の実験を行う場合を想定する。

リガンドの名前	Protein A（フローセル 2 に固定化済み）
測定温度	25℃
検出モード	2-1（フローセル 1 はリファレンスセル）
流速	20µl/min
アナライトの名前	mouse IgG（1 濃度）
アナライトのセット位置	R2A1
アナライト添加コマンド	INJECT 使用、40µl(2 分間)添加
再生溶液	10mM Gly-HCl(pH2)、20µl(1 分間)添加
再生溶液のセット位置	R2F3
レポートポイント 取得時間	①mouse IgG 添加 10 秒前に baseline の名で取得 ②mouse IgG 添加終了後 20 秒後に bound の名で baseline からの相対値として取得 ③再生溶液添加終了後 60 秒後に regeneration の名で baseline からの相対値として取得

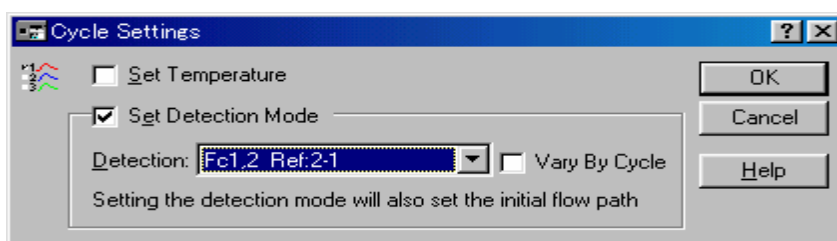
Run → **Run Application Wizard...**をクリックする。

↓

Customized Application を選択し、**Create New...**をクリックする。

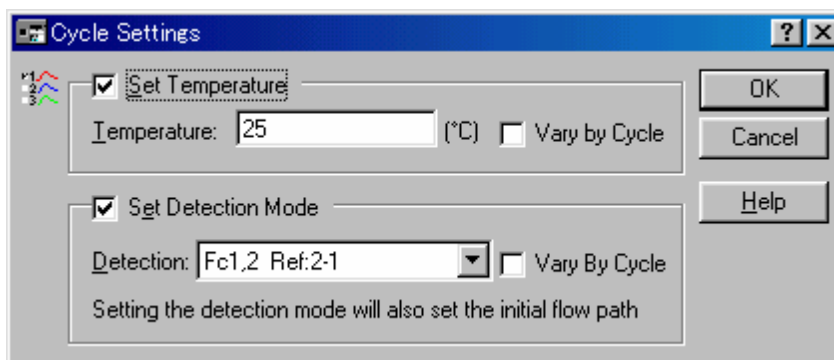
↓

予め、流速は **20µl/min** で実験を開始するよう設定されている。
上段のツールバーの左端のコマンドから設定を進めるとわかりやすい。

↓

（検出モードと温度の設定）

上記ツールバーのアイコンをクリックする。

Detection を選択する。
以下から選択することができる。

- Fc1
- Fc2
- Fc3
- Fc4
- Fc1,2　　Ref 2-1
- Fc1,2
- Fc1,2,3,4
- Fc1,2,3,4　　Ref 2-1,4-3
- Fc1,2,3,4　　Ref 2-1,3-1,4-1

引き続き、検出部位の温度を設定する。
Set Temperature にチェックをし、温度を入力する。4～40℃の範囲で設定できる。

OK をクリックすると、テーブル上に以下のように入力される。

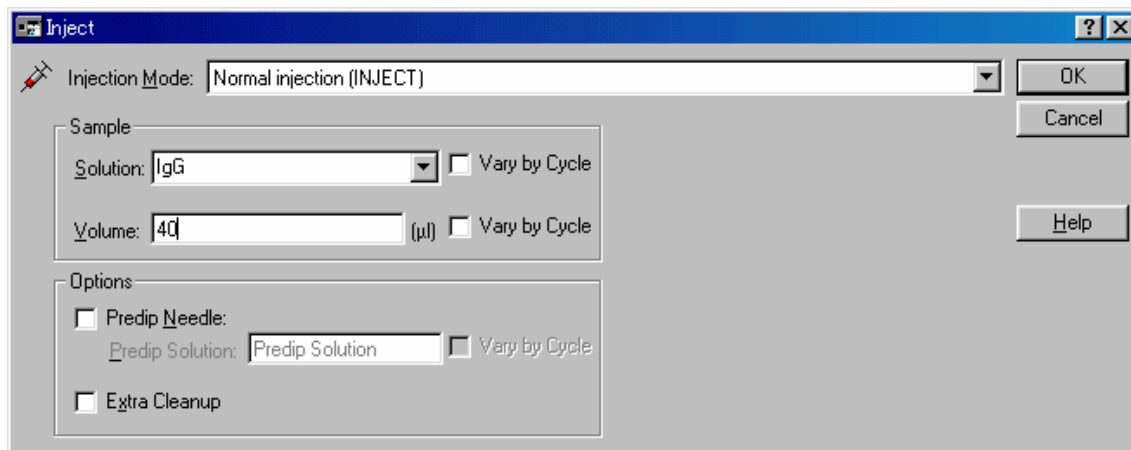
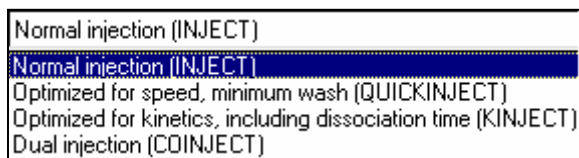
（設定温度に到達すると、測定が開始される。）

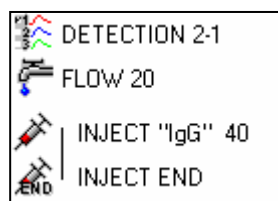
（流速の変更）

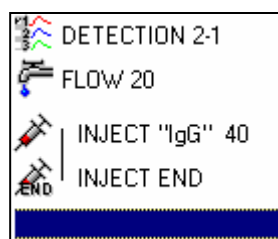
テーブル中の FLOW 20 をダブルクリックする。0～100 ul/min の範囲で設定できる。

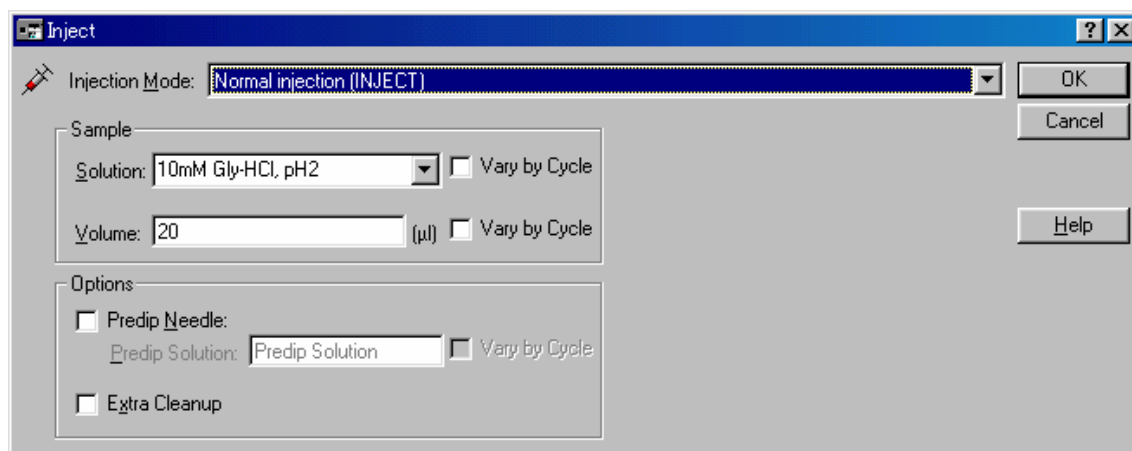
流速を入力し **OK** をクリックする。

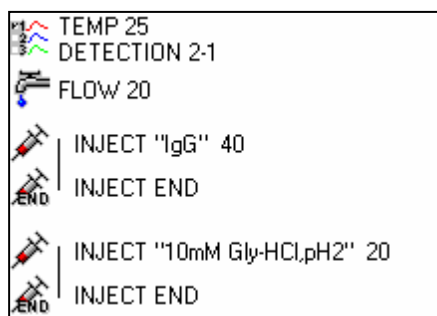
（アナライトの添加）

 をクリックする。

Injection Mode:の▼をクリックし、添加モードを変更する。

アナライトの名前および添加容量を入力し、**OK** をクリックする。

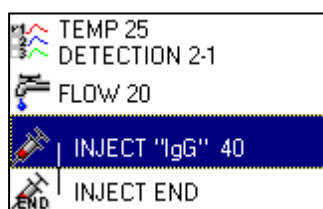
（注意）操作コマンドを入力する時は入力する位置をマウスでクリックし、ハイライトにする必要がある。上記アナライトの添加コマンドは、FLOW 20 の後に入力したいので、予め FLOW 20 の後をハイライトにする必要がある。

（再生溶液の添加）
添加を入力する位置をハイライトにする。

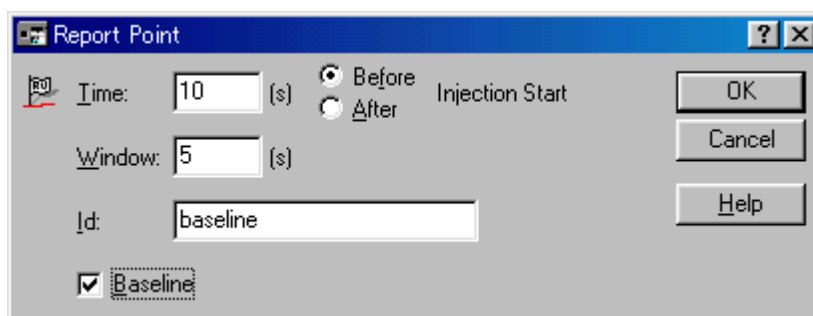
↓

をクリックする。

↓

再生溶液の種類、および添加容量を入力し、**OK** をクリックする。

↓

（レポートポイントの作成）

①アナライト添加前のレポートポイントの取得

INJECT “IgG” 40 をクリックし、ハイライトにする。

をクリックする。

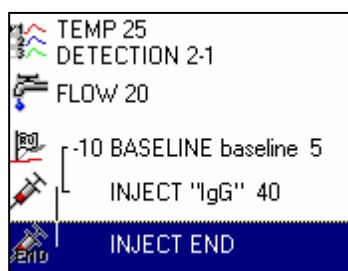
↓

Before にマークを入れ、**Time:**に 10 を入力する。

Id にレポートポイント名(ここでは baseline)を入力する。

この時のレスポンスを相対値 0 とする場合には、**Baseline** にチェックを入れ、**OK** をクリックする。

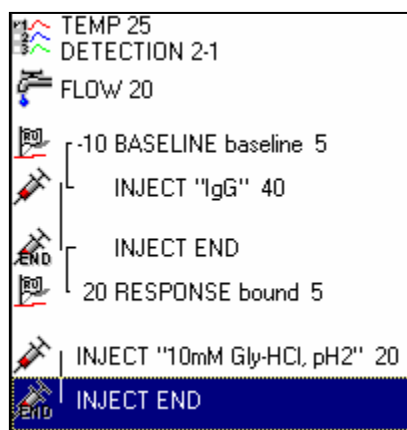
②アナライト添加終了後のレポートポイントの取得

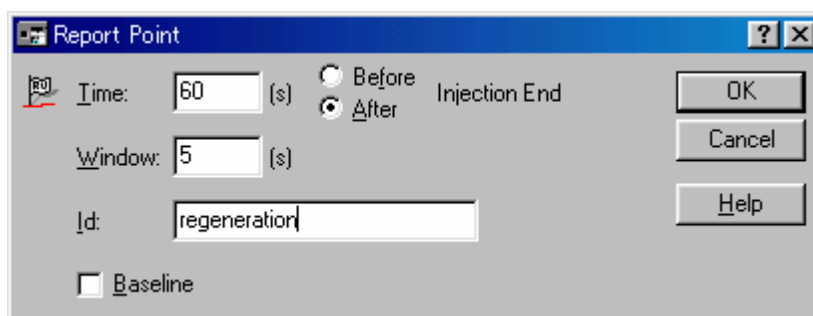
INJECT END(IgG 添加終了)をクリックし、ハイライトにする。

↓

をクリックする。

After にマークを入れ、**Time:**に 20、**Id** に bound と入力し、**OK** をクリックする。

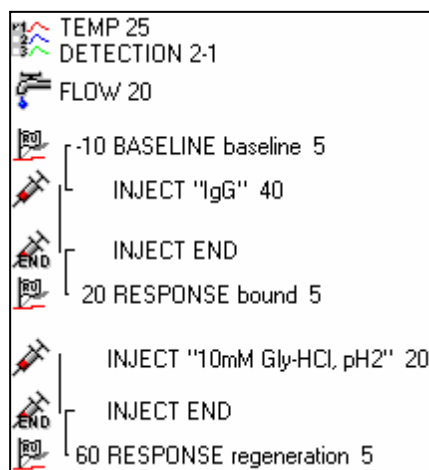
③再生後のレポートポイントの取得

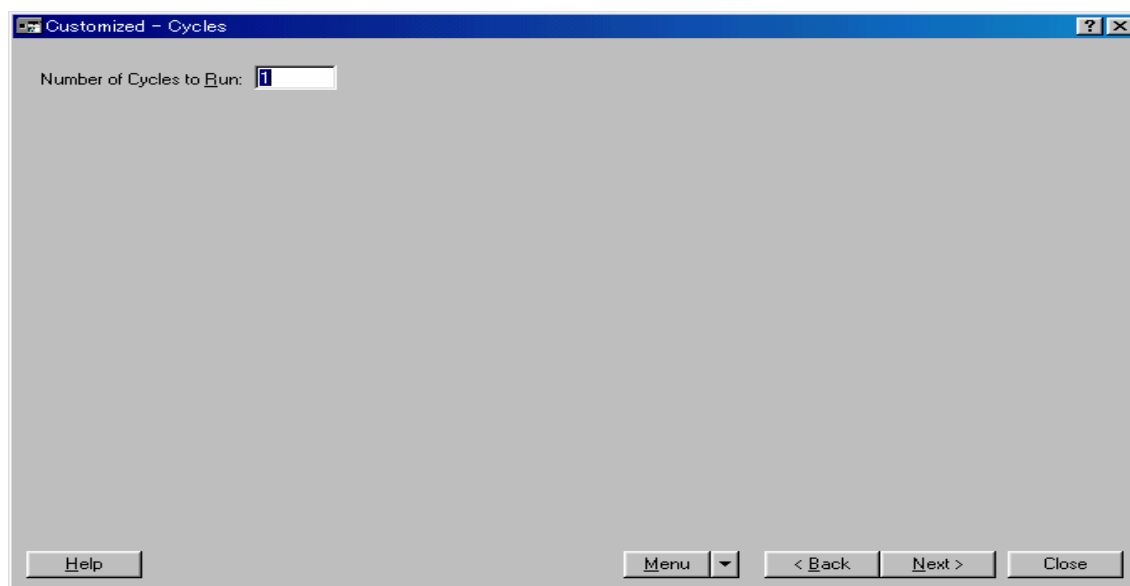
INJECT END(10mM Gly-HCl,pH2 添加終了)をクリックし、ハイライトにする。

をクリックする。

↓

必要事項を入力し、**OK** をクリックする。

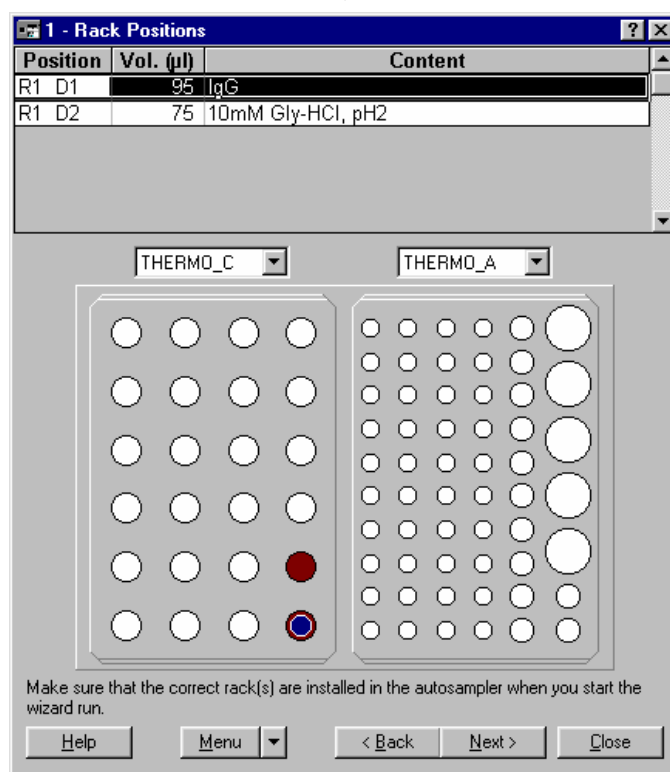
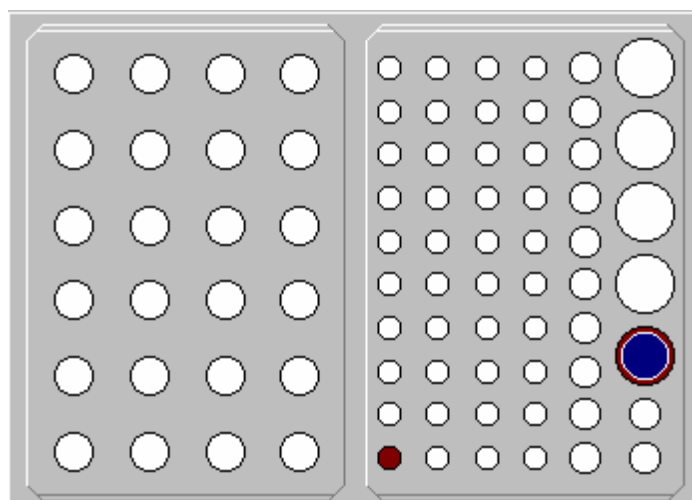
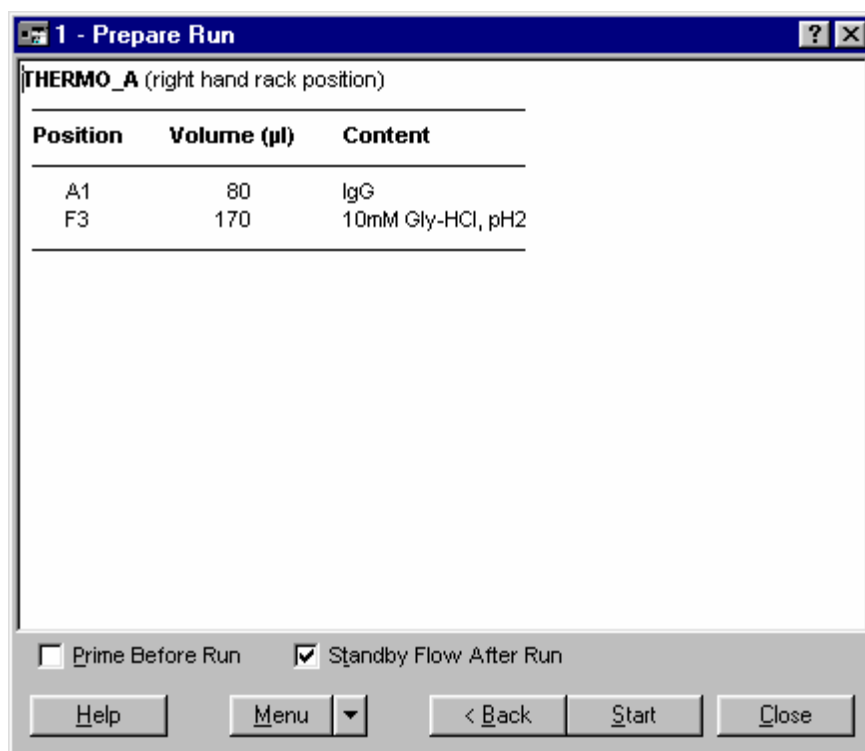
↓

一連の実験操作ができあがる。

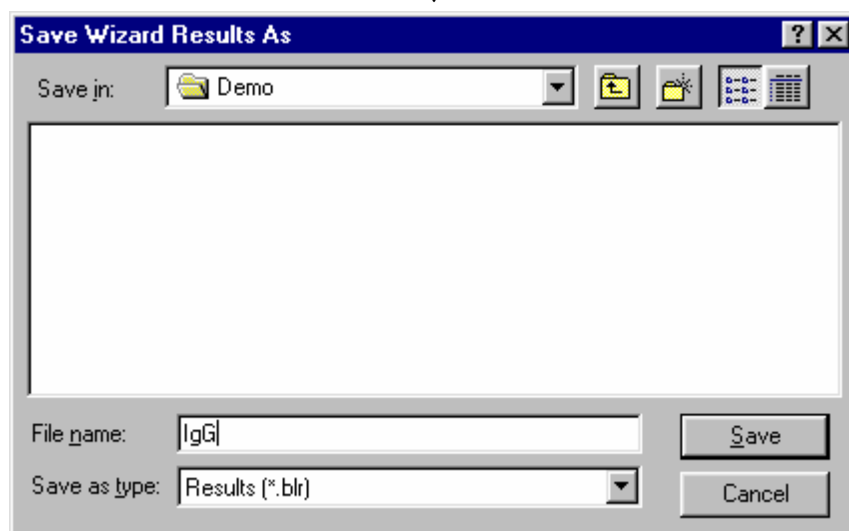
↓

テーブル下の **Next**＞をクリックする。

↓

実験の繰り返し回数を入力し（この場合には 1 回）、**Next**>をクリックする。

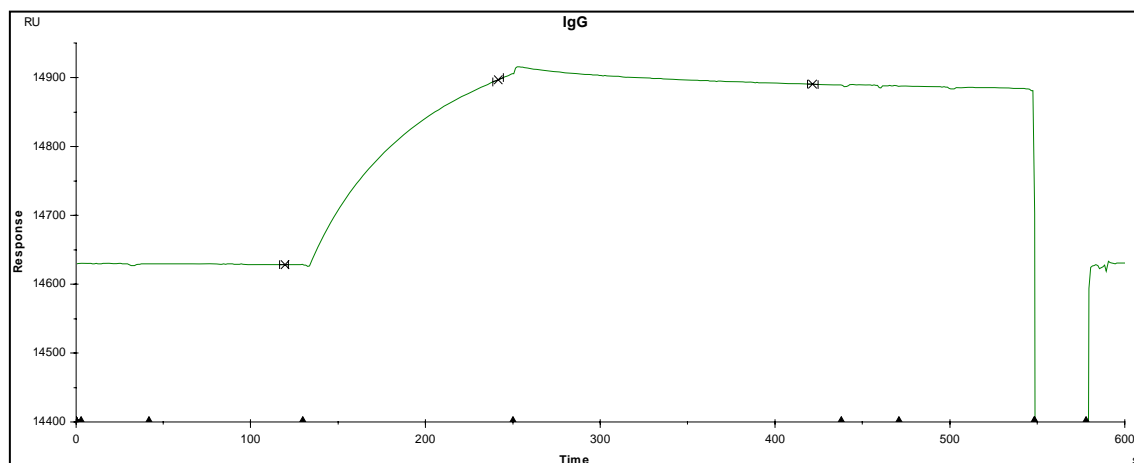
↓

↓

IgG と 10mM Gly-HCl,pH2 のバイヤル位置を移動する。位置を変更する場合には、ラック上の変更したいバイヤルをマウスで移動先までドラッグする。

↓

サンプルの位置および容量を再確認し、Standby Flow After Run にチェックを入れる。必要があれば Prime Before Run にチェックを入れる。**Start** をクリックする。

↓

ファイルの保存先を指定し、ファイル名を入力後、**Save** をクリックする。

↓

実験がスタートする。

(入力済コマンドの消去)

消去するコマンドをクリックし、ハイライトにする。

DETECTION 2-1
FLOW 20
INJECT "IgG" 40
INJECT END
INJECT "10mM Gly-HCl, pH2" 20
INJECT END

マウスの右ボタンをクリックする。

DETECTION 2-1
FLOW 20
INJECT "IgG" 40
INJECT END
INJECT "10mM
INJECT END

Edit Command...	**Ctrl+E**
Report Point...	Ctrl+R
Inject...	Ctrl+I
Comment...	Ctrl+A
Wait...	Ctrl+W
Transfer...	Ctrl+T
Mix...	Ctrl+M
Flow Path...	
Flow...	Ctrl+F
Wash...	
If-Then...	
Cycle Settings...	Ctrl+Y
Keyword...	Ctrl+K
Save Wizard Template	Ctrl+S
Save Wizard Template As...	
Print Sequence...	Ctrl+P
Print Wizard Template...	
Delete Command	Del

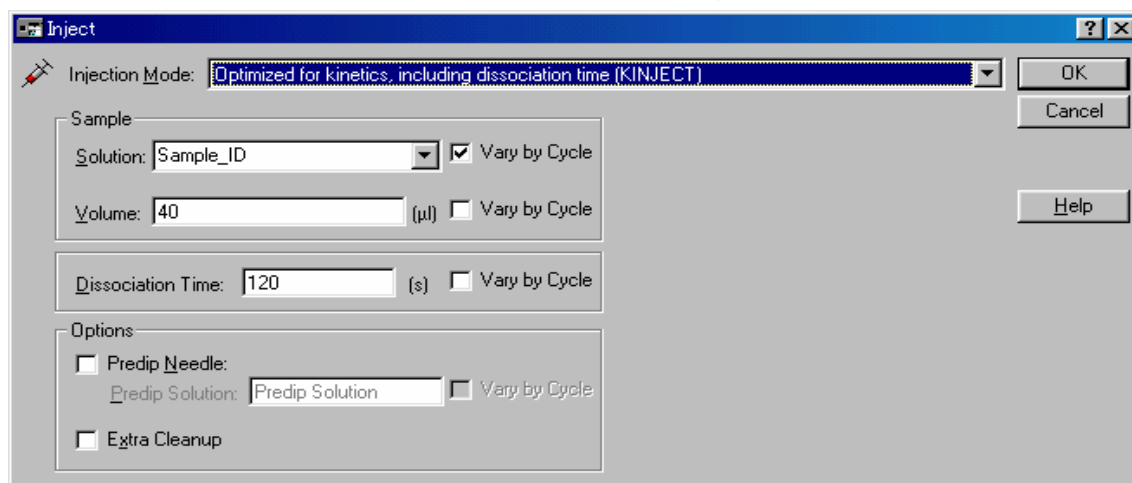
Help　Close

Delete Comnmand をクリックする。

ステップ 2. 複数個のアナライトについての分析

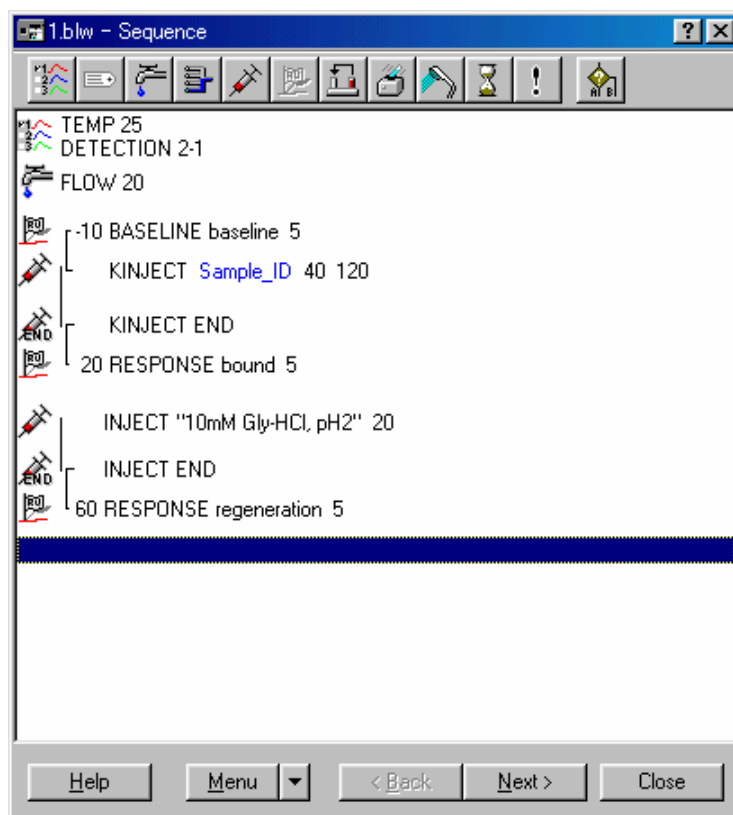
以下の条件で実験を行う Wizard を作成する。

リガンドの名前	Protein A（フローセル 2 に固定化済み）
測定温度	25℃
検出モード	2-1（フローセル 1 はリファレンスセルとして使用）
流速	20μl/min
アナライトの名前	IgG（5 濃度）
アナライトのセット位置	R2A1、R2A2、R2A3、R2A4、R2A5
アナライト添加コマンド	KINJECT 使用、40μl(2 分間)添加
解離時間	120 秒間
再生溶液	10mM Gly-HCl(pH 2)、20μl(1 分間)添加
再生溶液のセット位置	R2F3
レポートポイント 取得時間	①mouse IgG 添加 10 秒前に baseline の名で取得 ②mouse IgG 添加終了後 20 秒後に bound の名で baseline からの相対値として取得 ③再生溶液添加終了後 60 秒後に regeneration の名で baseline からの相対値として取得

ステップ 1 で作成した wizard を使用し解説する。
アナライトの添加コマンドをダブルクリックする。

Injection Mode:に **KINJECT** を選択し、**Dissociation Time:**に解離時間を入力する。
サンプルが複数存在する場合は、Sample Solution 行の Vary by Cycle にチェックを入れる。

一連の操作を表示すると以下のようになる。

Next>をクリックする。

↓

Sample_ID に 5 種類のアナライトの名前を入力する。

Repl は同一サンプルの繰り返し測定回数を入力し、**Run Oeder:**に測定順序を選択する。（測定順序は 118 ページ参照。）

Next>をクリックする。

↓

サンプル、試薬をセットし、必要に応じて位置を移動し、実験をスタートさせる。

ステップ **3. If/Then** 機能を活用した再生の省略

If/Then 機能とは、取得したレスポンスの高さから、その次の操作コマンドを省略したり、プログラム全体を終了させることのできる自動判断機能である。予め取得したレスポンスの評価基準の設定は必要となる。
If/Then 機能を活用することで、アナライトの結合が見られない場合に、再生操作を省略したり、再生が不充分な場合にのみ、より強い再生用液を引き続き添加することができる。再生操作の省略は、測定時間の短縮やリガンドの安定性保持につながり、結合物質のスクリーニング等の実験に有効である。

アナライトの結合量(レポートポイント名 **bound** の値)が **50RU** より少ない場合に、再生溶液の添加を削除し、次のサイクルに行くように作成する。
ステップ 2 の wizard を使用して解説する。

再生溶液の添加コマンドをクリックし、ハイライトにする。

をクリックする。

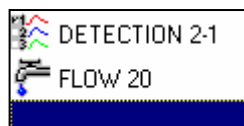
↓

（設定項目）

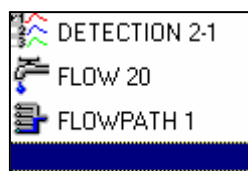
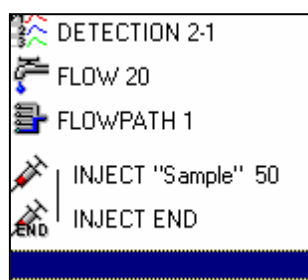
For Report Point	評価するレポートポイント名 取得した各種レポートポイント名が表示される。 その中から選択。
IF	レポートポイントの評価する種類 下記から選択。 RelResp　相対量（RU）＝結合量 AbsResp　絶対量（RU） Slope　傾き（RU/s）
In Flow cell	評価するセル 取得した全センターグラムのセルが表示される。 その中から選択。
Value	基準値 数値（RU）を入力
Comparison	基準値に対する評価対象範囲の数値 下記から選択 Is Greater Than Is Greater Than or Equals Is Less Than Is Less Than or Equals Equals
THEN	処理項目 Exsit Cycle　そのサイクルを終了し、次のサイクルへ進む。 Exsit Method　すべてのサイクルの測定を終了する。 Command Block　If/Then 内に支持する操作を実行する。（あわせて操作の入力が必要）

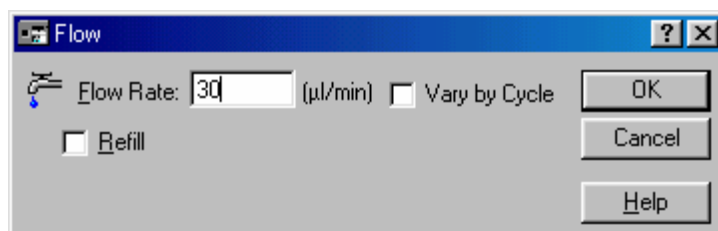
全評価項目について下記のように設定後、**OK** をクリックする。
For Report Point (bound), IF (RelResp), In Flow Cell (2-1), Value (50), Comparison (In less Than), THEN (Exit Cycle)

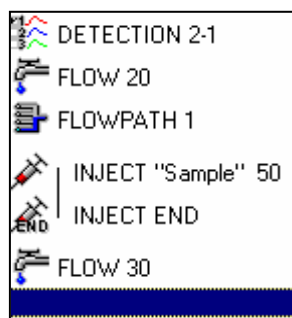
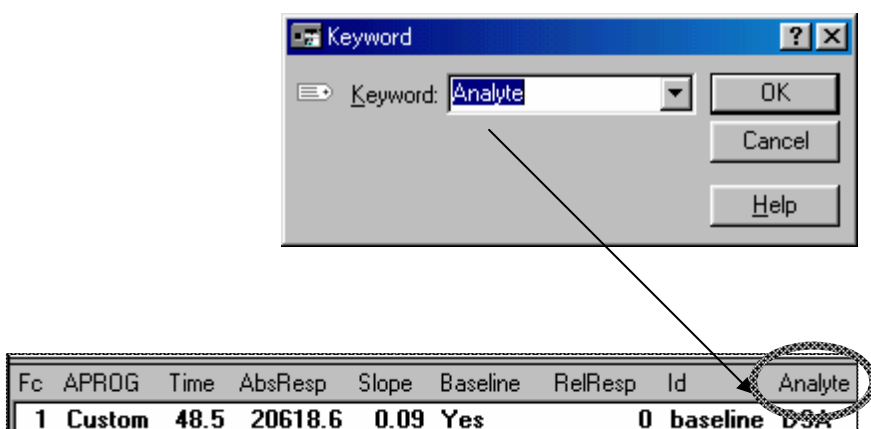
ステップ 4. 測定中の流路と流速の変更

（流路の変更）
特定のセルだけにリガンドをトラップしたり、再生する際に使用する。
流路を変更する箇所をクリックし、ハイライトにする。

をクリックする。

↓

流路を選択し、**OK** をクリックする。

サンプル等を添加する。

さらに流路を変更する場合には、同様の操作を行う。

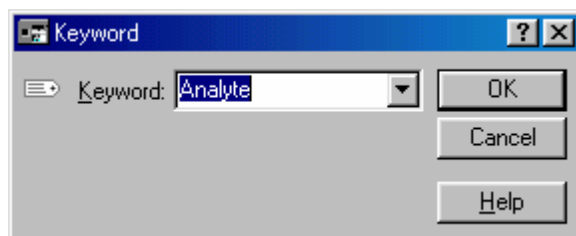
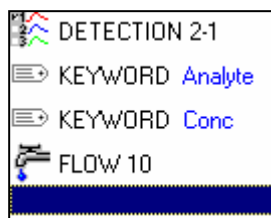
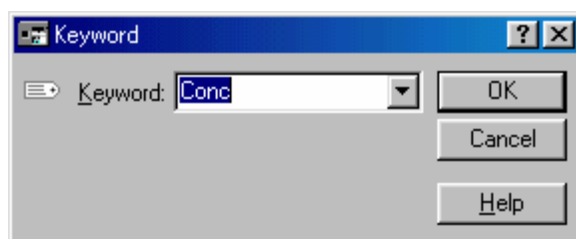
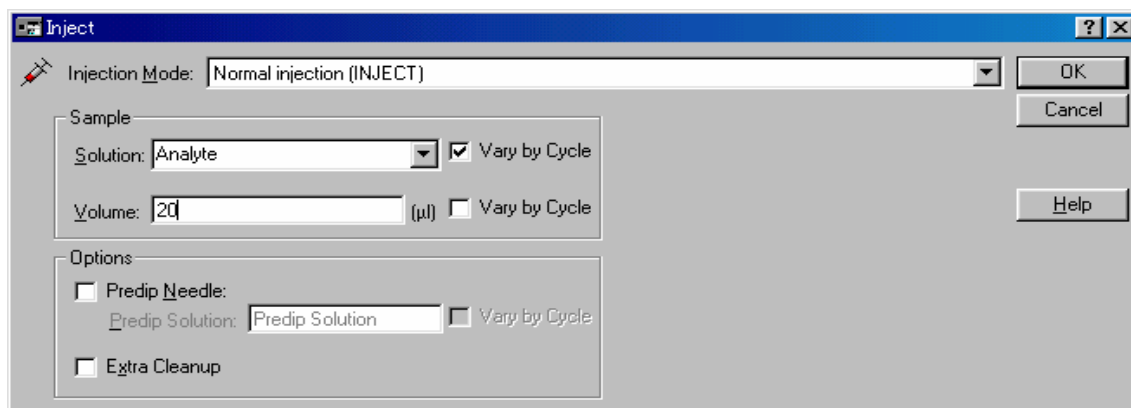
（流速の変更）
リガンドキャプチャー時（μl/min を遅くする）や再生液時（流速を速くする）に用いることが多い。
変更する箇所をクリックし、ハイライトにする。

をクリックする。

流速を入力し、**OK** をクリックする。

ステップ 5. 濃度測定
濃度測定を行う場合、キーワードを利用すると便利である。
キーワードとは、レポートポイントテーブル中にサンプル名あるいは濃度等の任意のコメントを表示させるツールである。Keyword で設定したコメントは、レポートポイントテーブルのカラム名として表示される。

濃度算出に必要な追加カラムは、アナライト名と濃度である。

以下のサンプルの濃度測定を例に説明する。

リガンドの名前	Protein A（フローセル 2 に固定化済み）
測定温度	25℃
検出モード	2-1（フローセル 1 はリファレンスセル）
流速	20μl/min
アナライトの種類	スタンダード IgG（5 段階の既知濃度） 5 種類の未知濃度サンプル
アナライトのセット位置	スタンダード：R2A1,R2A2,R2A3,R2A4,R2A5 未知濃度サンプル：R2B1,R2B2,R2B3,R2B4,R2B5
アナライト添加コマンド	INJECT 使用、40μl(2 分間)添加
再生溶液	10mM Gly-HCl(pH2)、20μl(1 分間)
再生溶液のセット位置	R2F3
レポートポイント 取得時間	①mouse IgG 添加 10 秒前に baseline の名で取得 ②mouse IgG 添加終了後 20 秒後に bound の名で baseline からの相対値として取得 ③再生溶液添加終了後 60 秒後に regeneration の名で baseline からの相対値として取得

アナライト名と濃度のカラムをレポートポイントテーブルに作成する。
ステップ 2 の wizard を利用して解説する。

をクリックする。

Keyword:に **Analyte** と入力し、**OK** をクリックする。
同様に **Conc**（濃度）についても作成する。

テーブル中の **KINJECT Sample_ID 40 120** をダブルクリックする。

Solution：に Keyword で入力した Analyte を選択する。

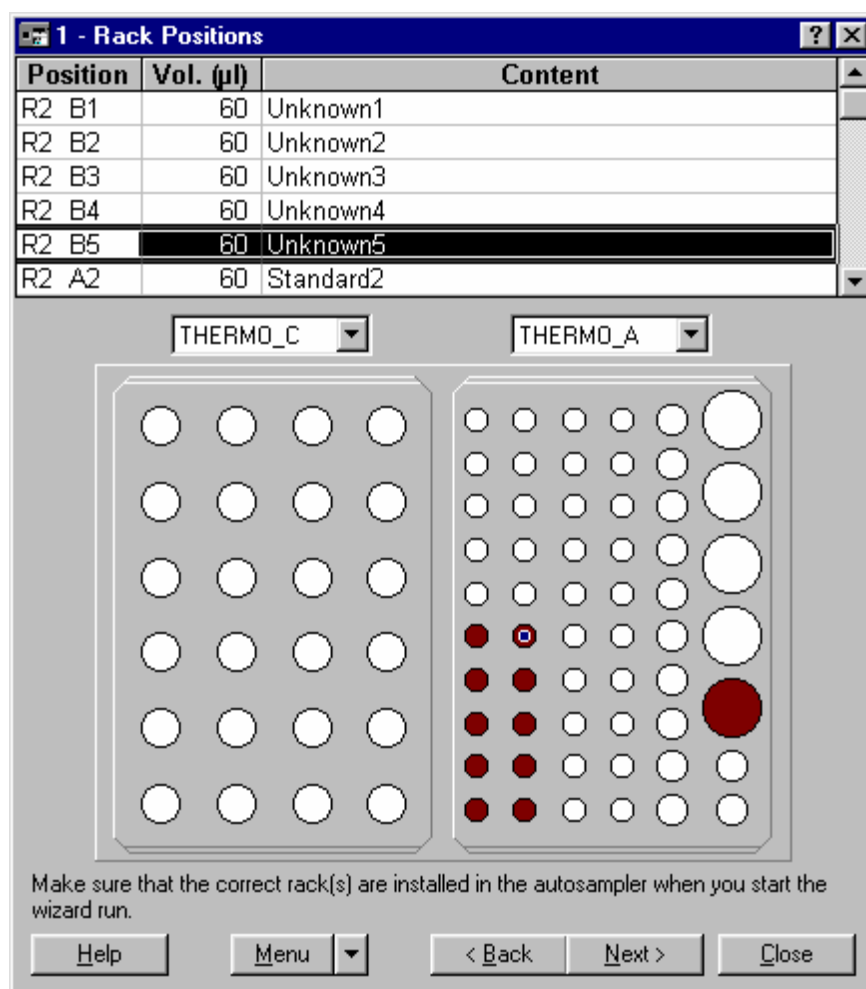
↓

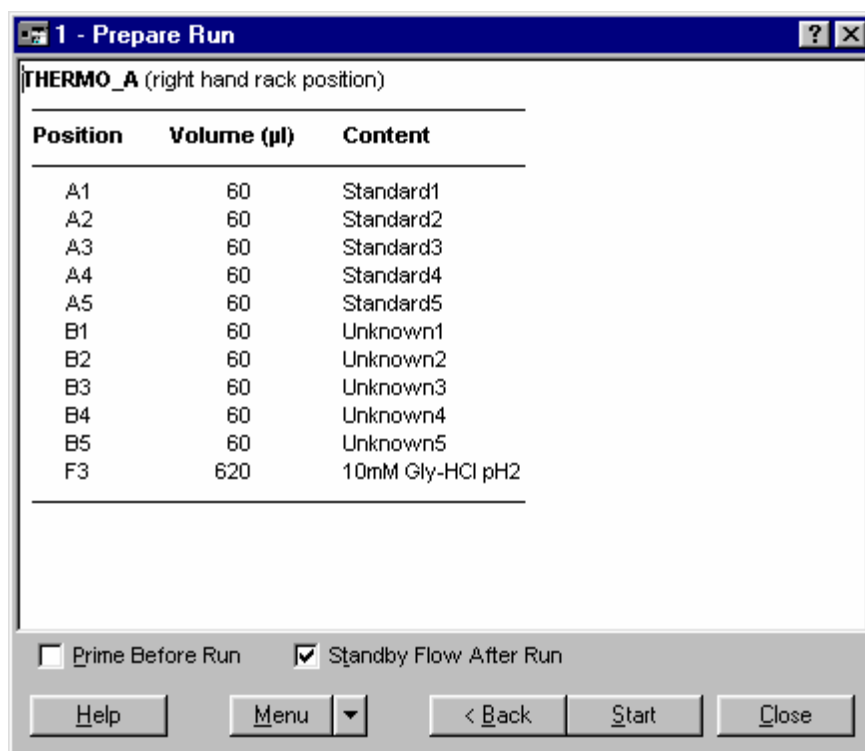
Next＞をクリックする。

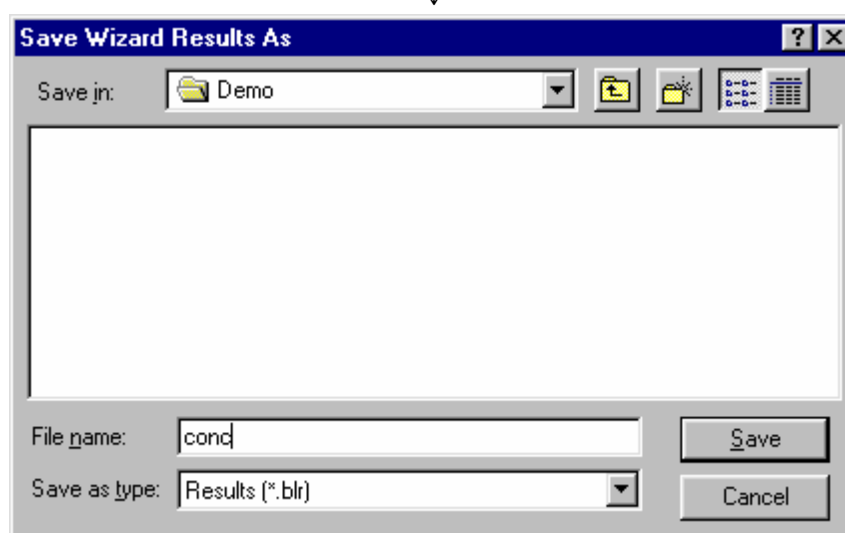
↓

Repl に同一サンプルの繰り返し測定回数、Analyte にはサンプル名、および Conc に濃度を入力する。

(注意) Conc には、μg/ml などの単位は入力しない。また、同カラムにおいて、未知濃度サンプルは文字列として認識するコメントを入力する。
(例 1/100、1/2 等の希釈倍率や unknown 等のコメントは文字列として認識されるが、1,2 は不適)

Next>をクリックする。

↓

サンプル、試薬をセットし、**Next**＞をクリックする。

サンプルの位置および容量を再確認し、Standby Flow After Run にチェックを入れる。必要があれば Prime Before Run にチェックを入れる。**Start** をクリックする。

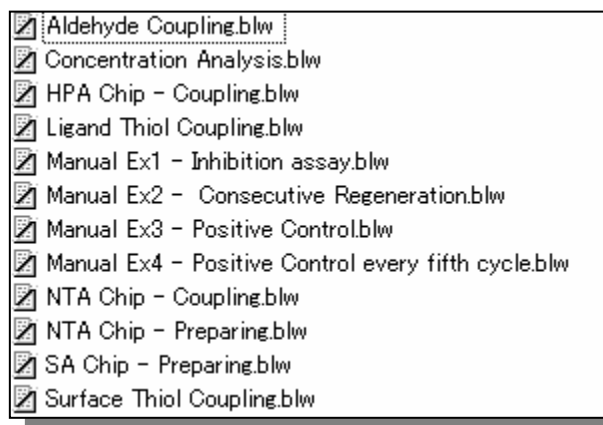
↓

保存先のフォルダーを指定し、ファイル名を入力し、**Save** をクリックする。

↓

実験が開始される。

9-8. Wizard Template

Biacore 2000 では、あらかじめ作成頻度が高い **Wizard Template** が C:/Program Files/BIACORE2000/Guide/Methods/Wizard Templates フォルダー内に保存されて

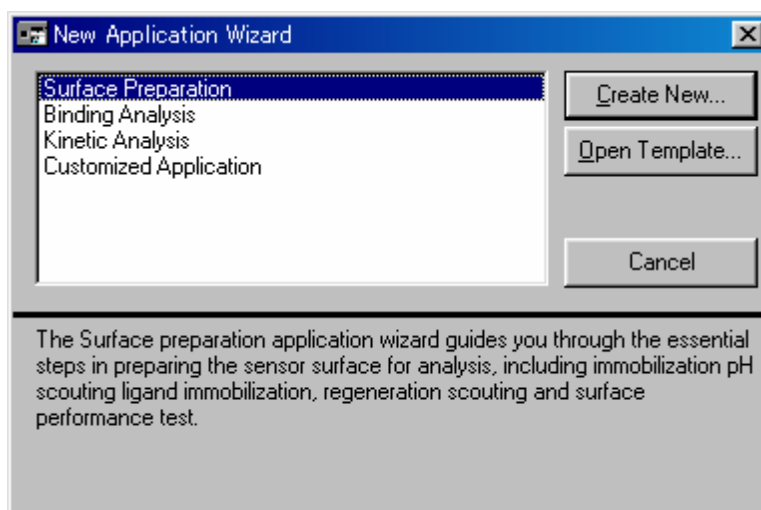
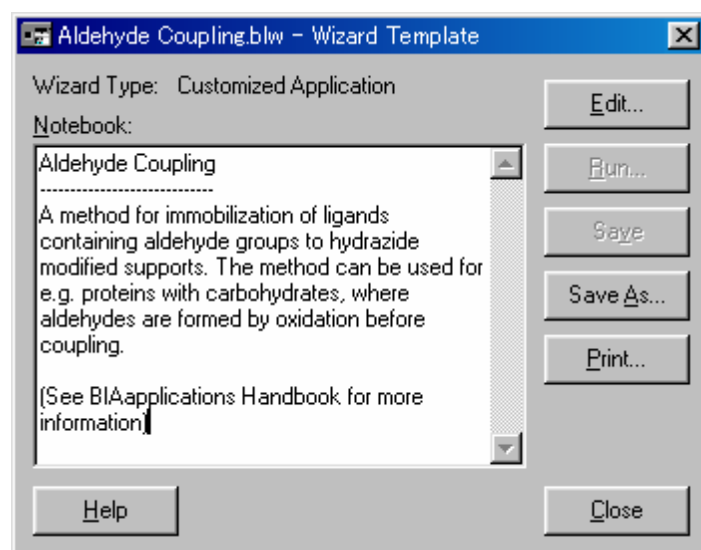
Aldehyde Coupling.blw
Concentration Analysis.blw
HPA Chip - Coupling.blw
Ligand Thiol Coupling.blw
Manual Ex1 - Inhibition assay.blw
Manual Ex2 - Consecutive Regeneration.blw
Manual Ex3 - Positive Control.blw
Manual Ex4 - Positive Control every fifth cycle.blw
NTA Chip - Coupling.blw
NTA Chip - Preparing.blw
SA Chip - Preparing.blw
Surface Thiol Coupling.blw

いる。

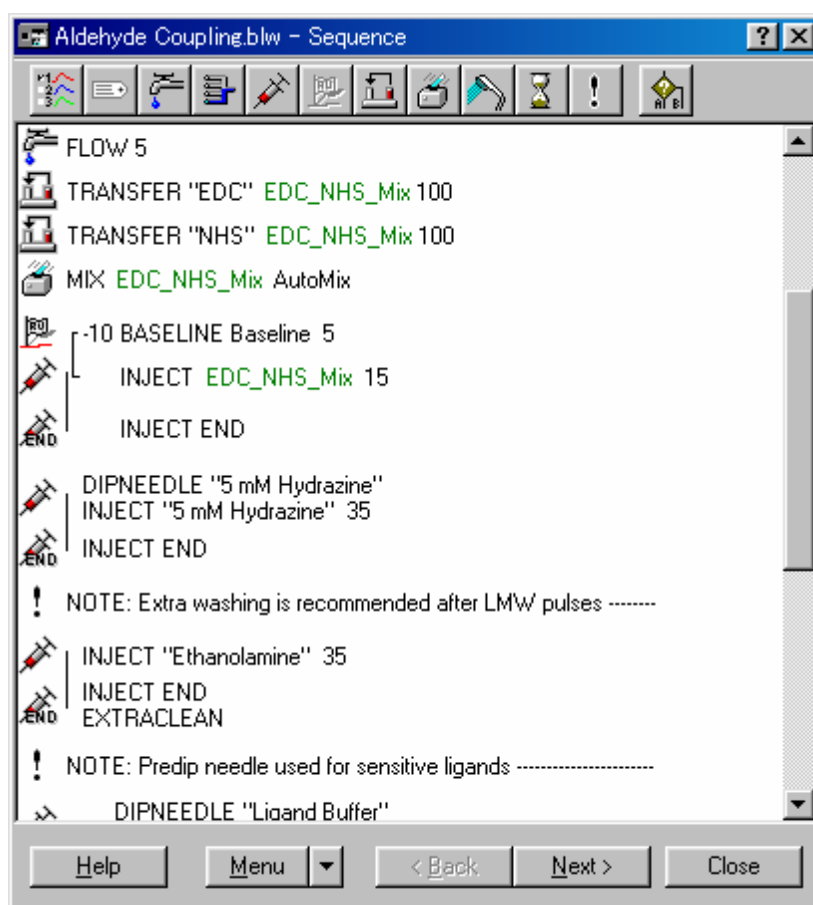
・アルデヒドカップリング
・濃度測定
・HPA センサーチップへの固定化
・リガンドチオールカップリング
・阻害実験
・スクリーニング
・リガンドの活性チェックを組み込んだスクリーニング
・5 サンプル毎にリガンドの活性チェックを組み込んだスクリーニング
・NTA センサーチップへの固定化
・NTA センサーチップ前処理
・SA センサーチップ前処理
・表面チオールカップリング

これらの方法を用いて実験を行うときには、Template を利用すると便利である。次に、アルデヒドカップリング、HPA センサーチップへの固定化、リガンドチオールカップリングについて wizard を説明する。

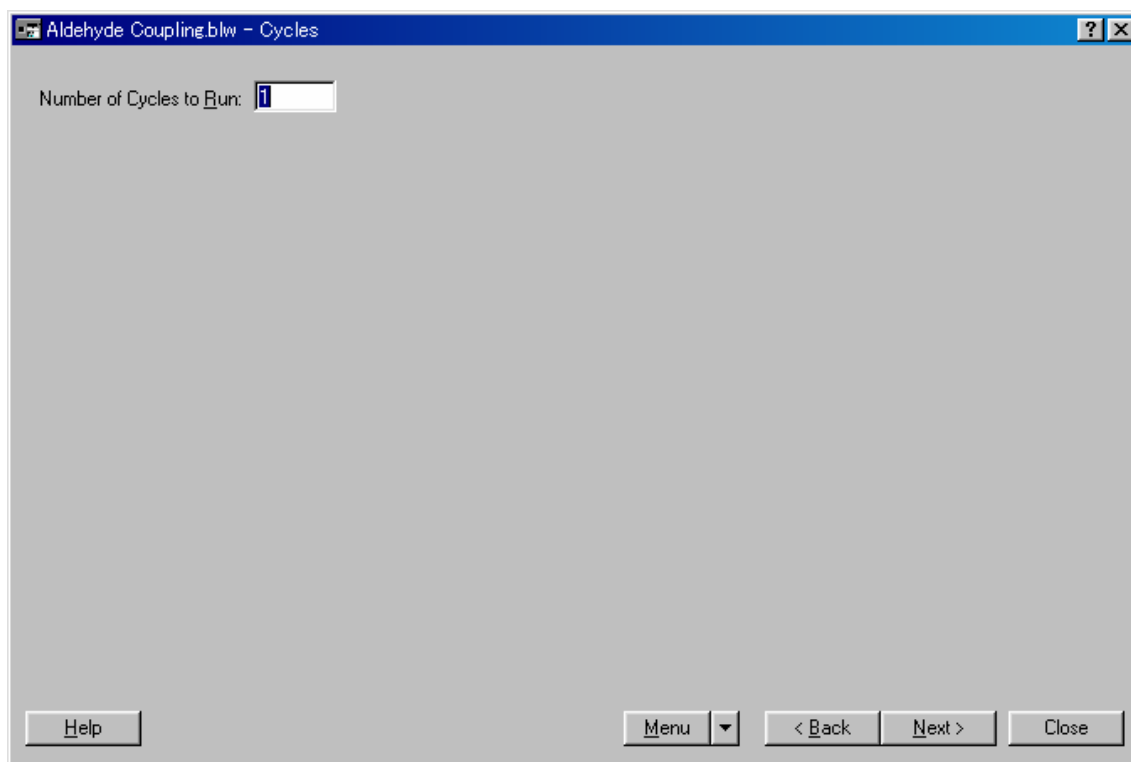
9-8-1. アルデヒドカップリング
糖タンパク質の糖鎖を介して固定化する方法である。あらかじめ糖タンパク質リガンドをメタ過よう素酸で還元し、糖鎖の非還元末端を開裂（ホルミル基に）させる。また、センサーチップ表面は、ヒドラジン等でカルボキシル基の末端にアミノ基を導入する。メタ過よう素酸処理済リガンドを添加し、シッフ塩基で カップリング後、還元して（アマドイ転移）固定化する方法である。
詳しくは、Sensor Surface Handbook を参照すること。

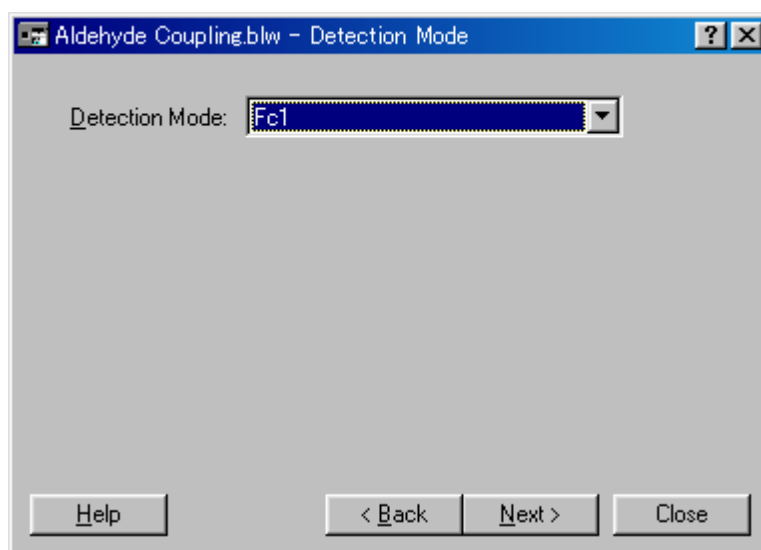
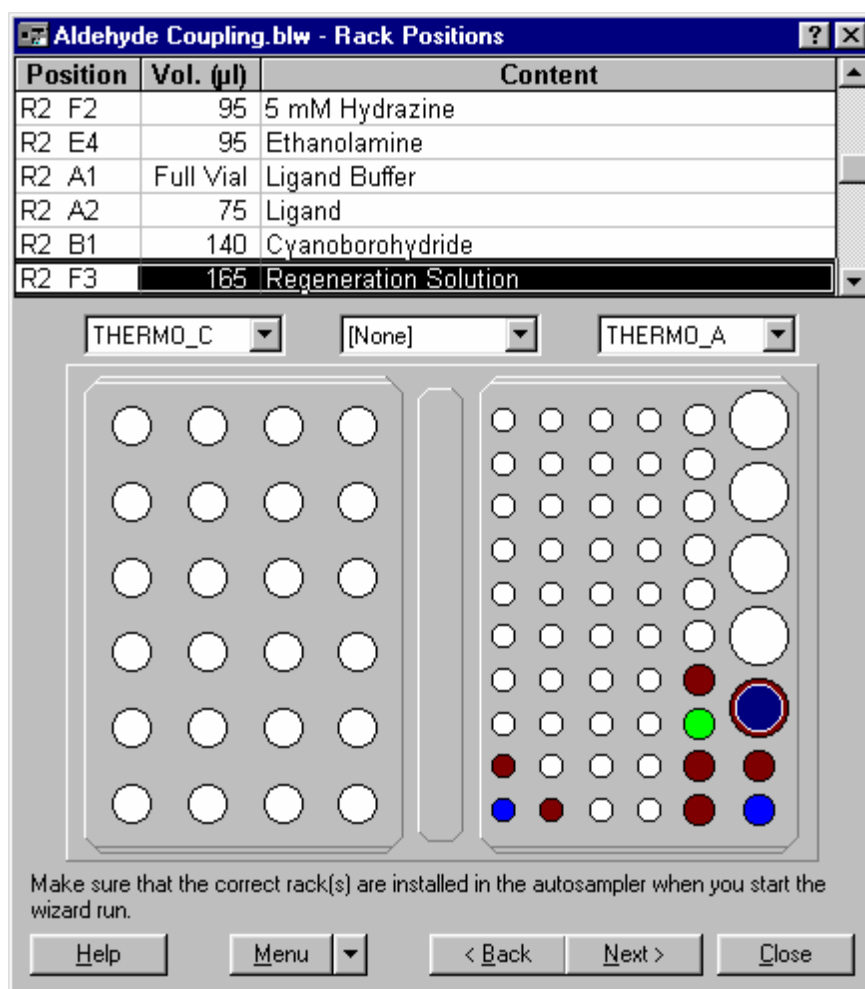
（準備するもの）
・NHS
・EDC
・エタノールアミン
・10mM 酢酸緩衝液
・5mM ヒドラジン
・メタ過よう素酸処理糖タンパク質（Sensor Surface Handbook を参照）
・0.1M Na-cyanoborohydride in 0-1M Acetate buffer (pH4)
・再生溶液（例、10mM Gly-HCl, pH2）

（方法）
Run → Run Application Wizard...をクリックする。

Open Template...をクリックする。
C:＼Program Files＼BIACORE 2000＼Guide＼Methods＼Wizard Template を開き **Aldehyde Coupling.blw** を選択する。

Edit...をクリックする。

↓

一連の操作の Wizard Template が表示される。

Next>をクリックする。

↓

Number of Cycle of Run に測定繰り返し測定回数 1 を入力し、**Next**>をクリックする。

↓

使用するフローセルを選択し、**Next**>をクリックする。

サンプル、試薬をセットし、**Next**＞をクリックする。

（上記の場合のセット位置例）

R2A1：リガンド希釈液（バイヤルに 8 分目以上分注。リガンド添加前のニードル洗浄に使用。）

R2A2：リガンド（～50µg/ml）

R2B1：0.1M Na-cyanoborohydride/ 0.1M Na-acetatebuffer (pH4)

R2E1：EDC

R2E2：NHS

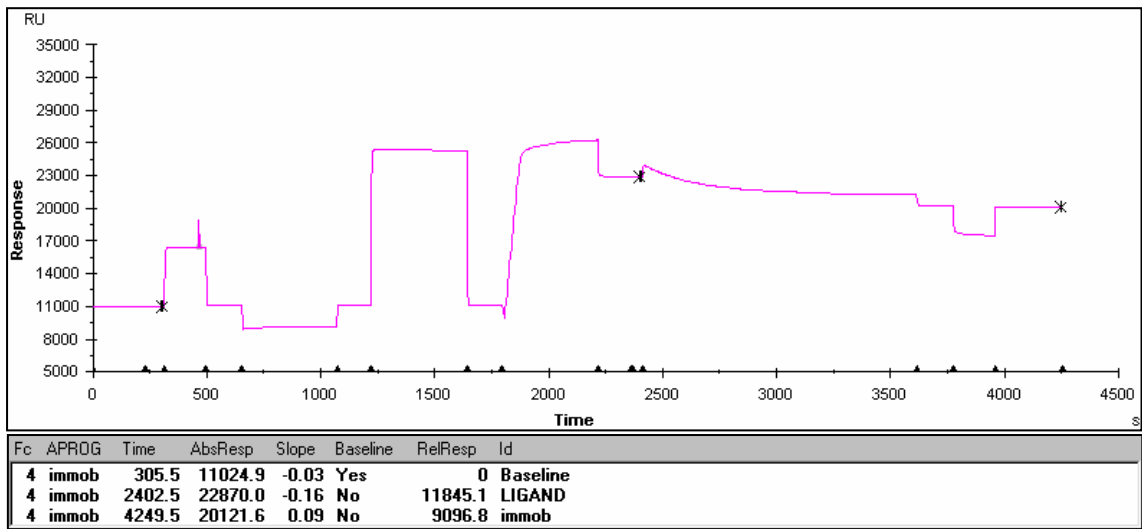
R2E3：混合用空バイヤル

R2E4：1M エタノールアミン塩酸, pH 8.5

R2F1：5mM ヒドラジン溶液（バイヤルに 8 分目以上分注。ヒドラジン添加前のニードル洗浄に使用）

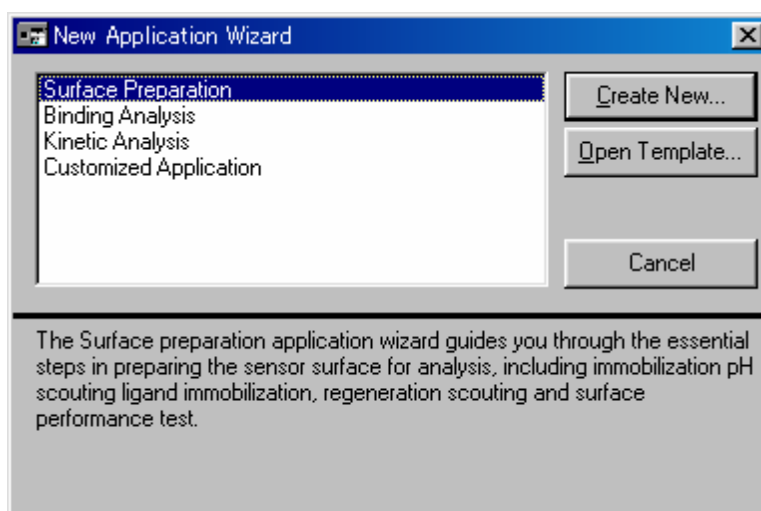
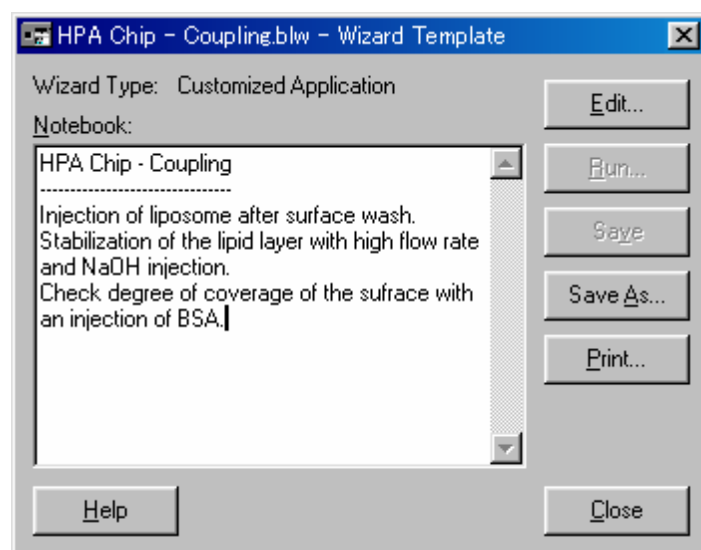
R2F2：5mM ヒドラジン

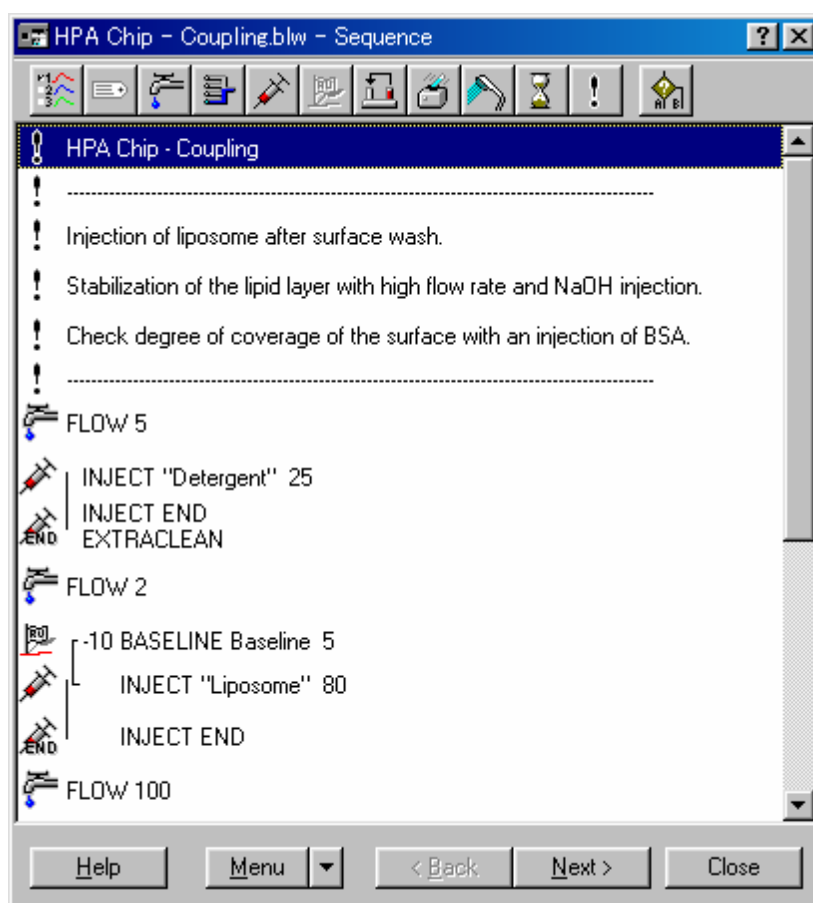
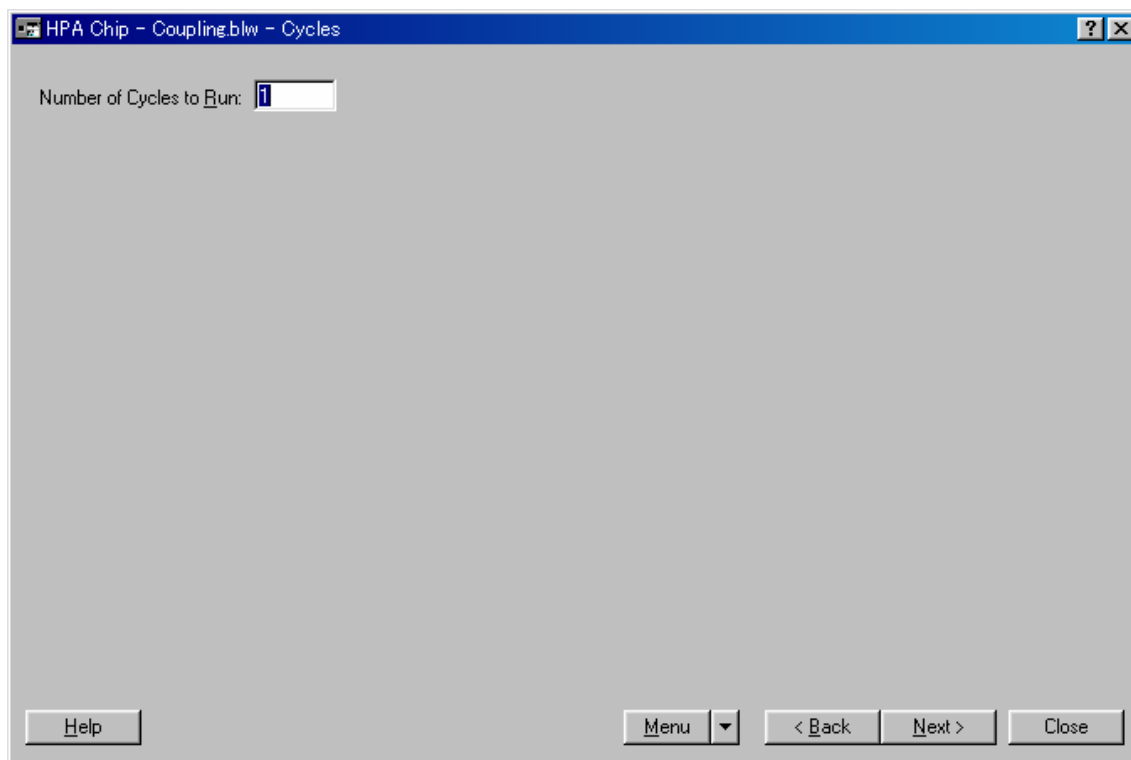
↓

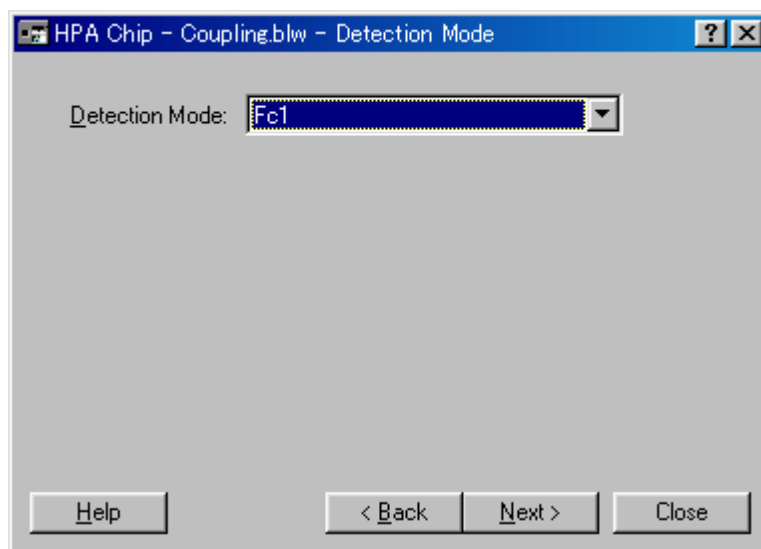
サンプル位置および容量を確認後、**Start** をクリックする。続いて、保存先のフォルダーを指定し、ファイル名を入力して **Save** をクリックすると、実験が開始される。

9-8-2. HPA センサーチップへの固定化

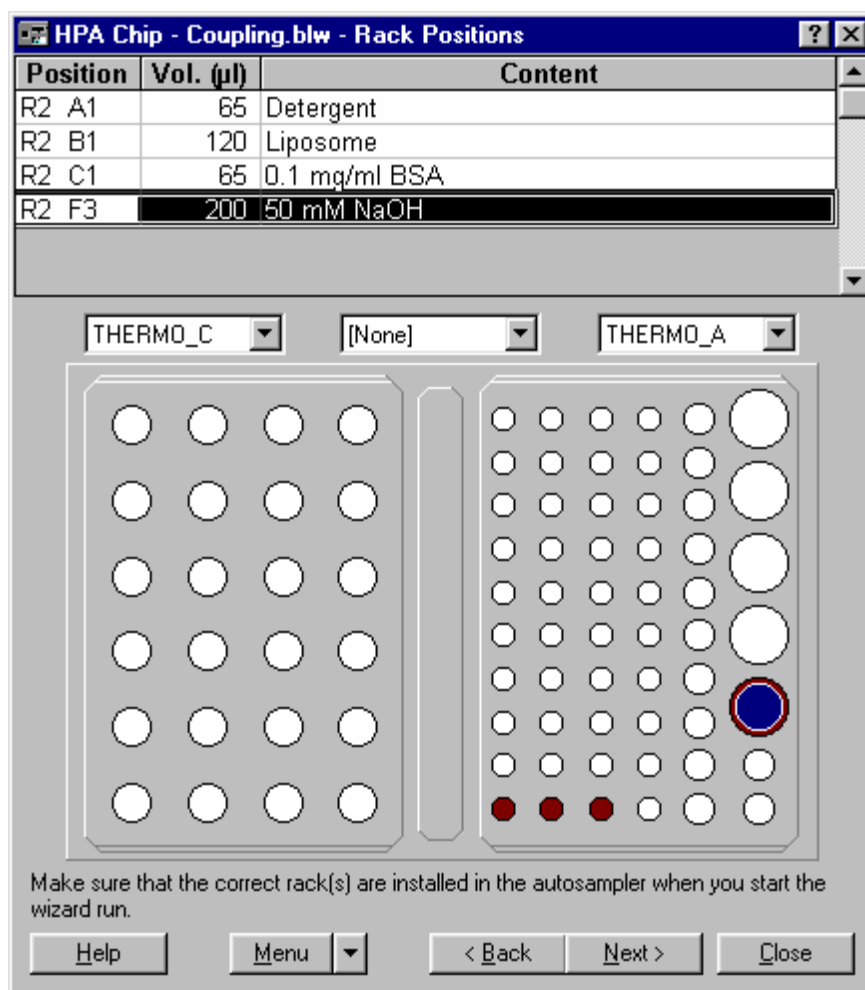
HPA センサーチップを使用して、糖脂質やリン脂質で構成されたリポソームを添加し、脂質一重膜として固定化する方法である。
詳しくは、センサーチップ添付の資料を参照のこと。

(準備するもの)

・0.5mM リポソーム
・界面活性剤（20mM CHAPS あるいは 40mM Octylglucoside 等）
・0.1mg/ml BSA
・50mM NaOH

Open Template...をクリックする。
C:＼Program Files＼BIACORE 2000＼Guide＼Methods＼Wizard Template を開き、**HPA Chip – Coupling.blw** をクリックする。

Edit...をクリックする。

↓

一連の実験の **Wizard Template** が表示される。
必要により、内容を変更し、**Next**>をクリックする。

Number of Cycle to Run：に測定繰り返し回数 1 を入力し、**Next**＞をクリックする。

↓

使用するフローセルを選択後、**Next**＞をクリックする。

↓

サンプル、試薬をセットし、**Next**＞をクリックする。

(サンプル位置の例)

R2A1：界面活性剤

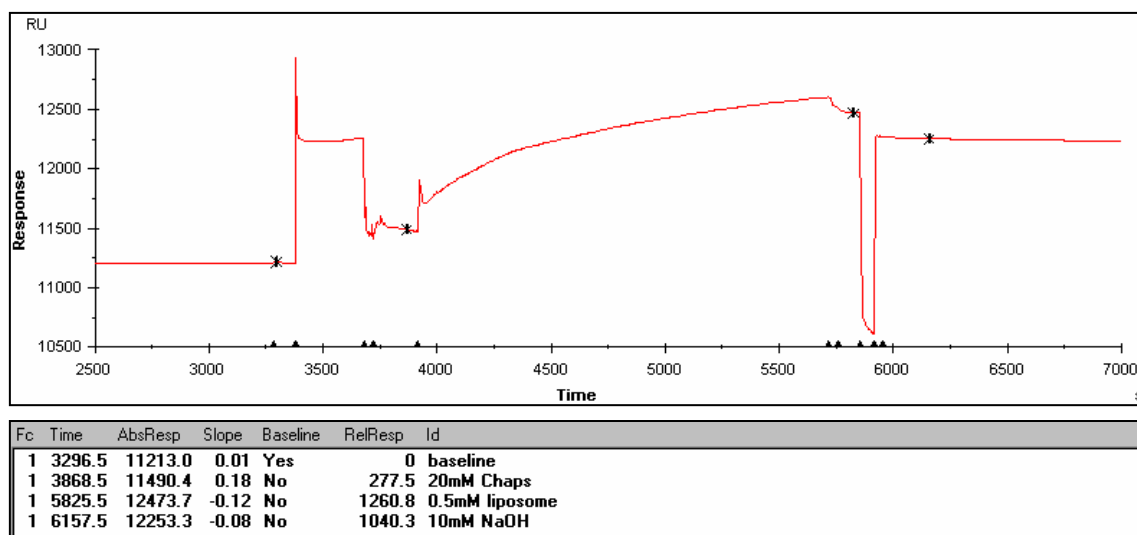
R2B1：リポソーム

R2C1：0.1mg/ml BSA

R2F3：50mM NaOH

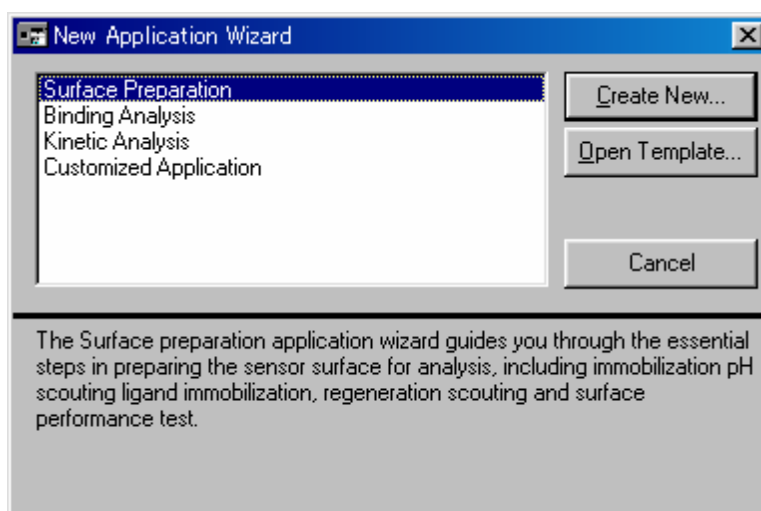
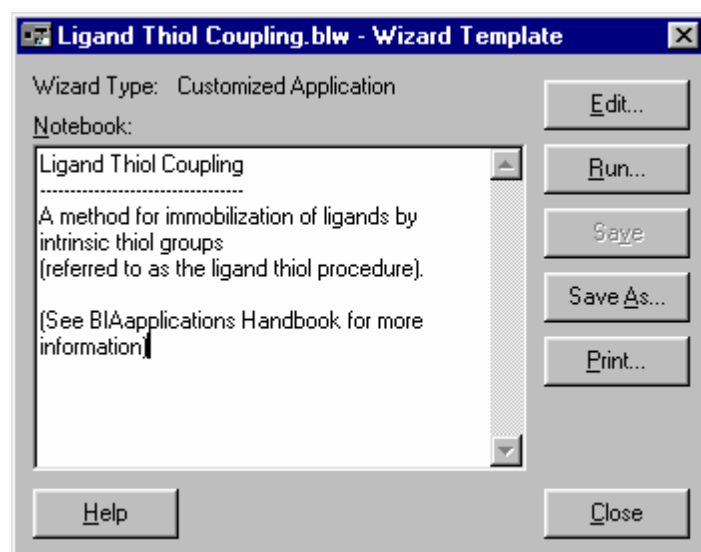
↓

サンプル位置および容量を確認し、**Start** をクリックする。保存先のフォルダーを指定し、ファイル名を入力し、**Save** をクリックすると実験が開始される。

Fc	Time	AbsResp	Slope	Baseline	RelResp	Id
1	3296.5	11213.0	0.01	Yes	0	baseline
1	3868.5	11490.4	0.18	No	277.5	20mM Chaps
1	5825.5	12473.7	-0.12	No	1260.8	0.5mM liposome
1	6157.5	12253.3	-0.08	No	1040.3	10mM NaOH

9-8-3. リガンドチオールカップリング

リガンド表面にある遊離のチオール基を介して固定化する方法である。

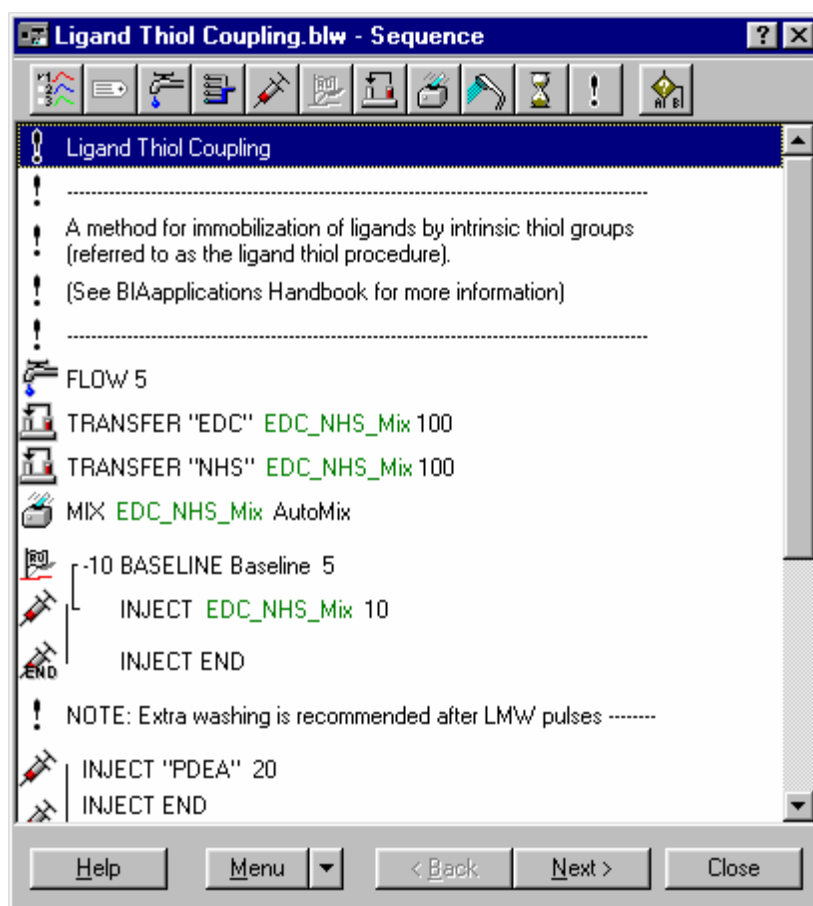
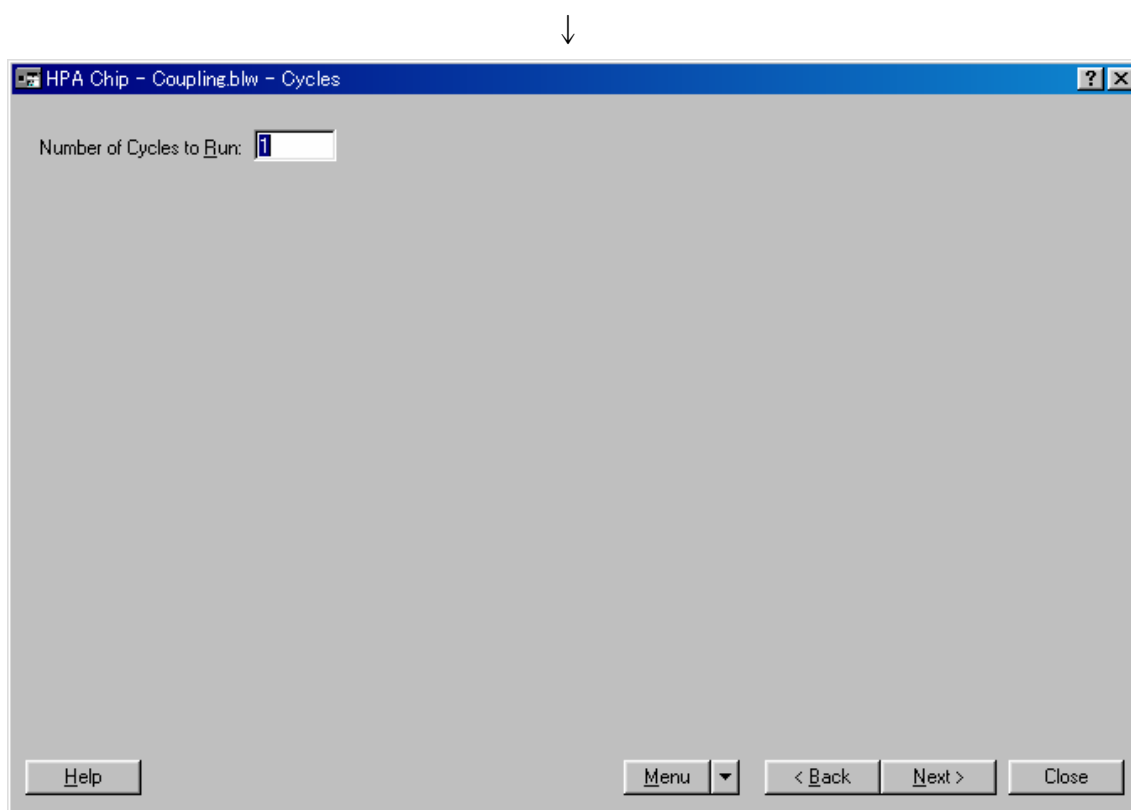
（準備するもの）

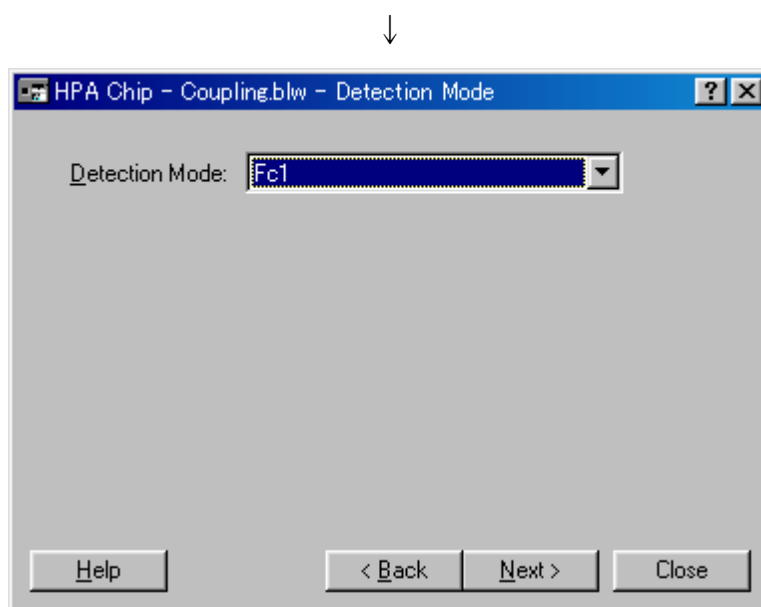
・リガンド（プレコンセントレーション効果のある緩衝液に希釈したもの。）
・NHS
・EDC
・10mM 酢酸緩衝液
・80mM PDEA in 0.1M Borate buffer(pH8.5)
・50mM l-cysteine-1M NaCl in 0.1M Formate buffer(pH4.3)

Open Template...をクリックする。
C:＼Program Files＼BIACORE 2000＼Guide＼Method＼Wizard Template を開き、
Ligand Thiol Coupling.blw をクリックする。

↓

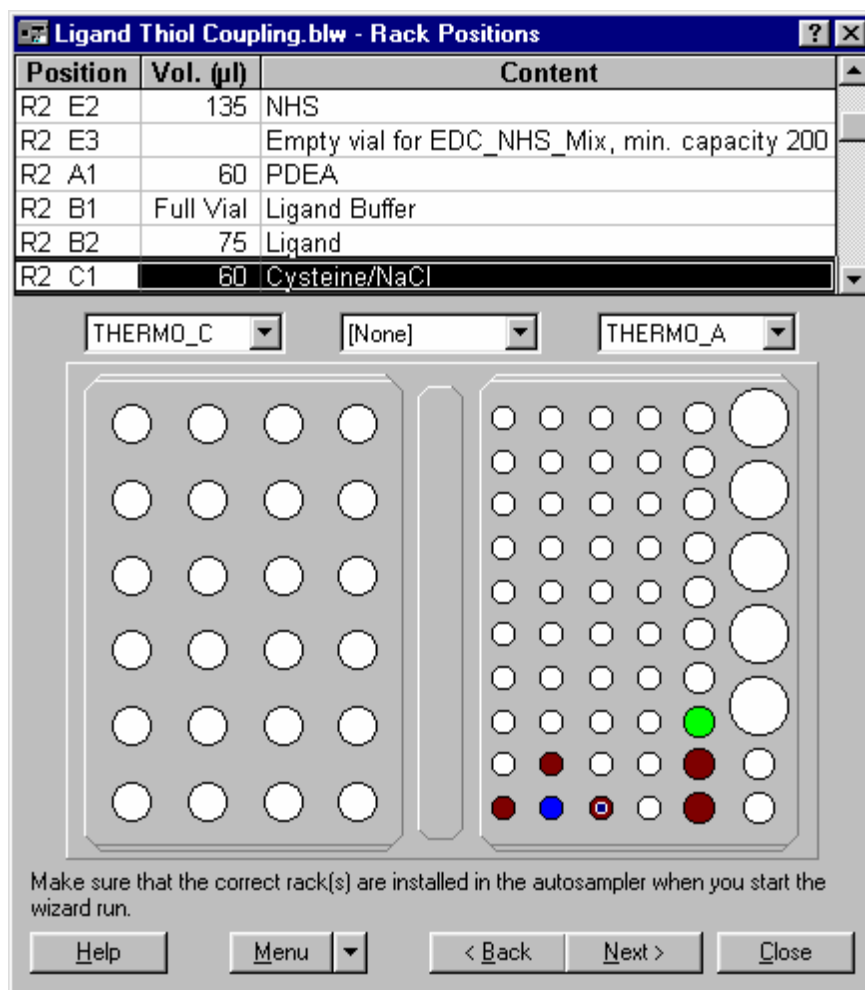
Edit...をクリックする。

↓

一連の実験の Wizard Template が表示される。
必要により、内容を変更し、**Next>**をクリックする。

↓

Number of Cycle to Run：に繰り返し測定回数 1 を入力し、**Next**＞をクリックする。

↓

使用するフローセルを選択後、**Next**>をクリックする。

↓

表示の位置にサンプルをセットするか変更して、**Next**＞をクリックする。

（セット位置の例）

R2A1：PDEA（4.5mg in 250µl 100mM Borate buffer, pH 8.5 ）

R2B1：リガンド希釈液（バイヤルに 8 分目以上分注。リガンド添加前ニードル洗浄用。）

R2B2：リガンド

R2C1：L-cystein (1.5mg)／NaCl (14mg) in 250µl 0.1M Sodium formate Buffer (pH 4.5)

R2E1：EDC

R2E2：NHS

R2E3：NHS/EDC 混合用空バイヤル

↓

サンプルの位置および容量を再確認し、Standby Flow After Run にチェックを入れる。必要があれば Prime Before Run にチェックを入れる。**Start** をクリックする。保存先のフォルダーを指定し、ファイル名を入力して **Save** をクリックする。

↓

索引

[あ]

[か]

[さ]

[た]

[な]

[は]

[ま]

[ら]

INDEX

[W]

安全上のご注意

必ずお守りください

このしおりには、弊社機器に関する一般的な注意事項を記載しています。取扱いの詳細は必ず製品添付の使用説明書をご覧ください。

誤った取扱いをした場合に生じる危険や損害の程度を、次の区分で説明しています。

警告 誤った取扱いをした場合に、死亡や重傷を負う可能性があるもの。

注意 誤った取扱いをした場合に、傷害または物的損害が発生する可能性があるもの。

図記号の意味は次の通りです。

禁　止

⃠は、してはいけない「禁止」を示します。

❗は、必ず実行していただく「強制」を示します。

警告

禁　止

電源プラグの抜き差しにより、運転を停止しない

火災・感電の原因になります。

禁　止

電源コード・電源プラグを傷つけない

●加工しない　●束ねない　●ねじらない
●折らない　●物をのせない　●加熱しない
●無理に曲げない

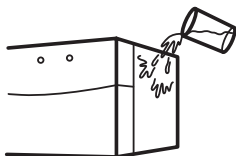
破損して火災・感電の原因になります。

根元まで差込む

電源プラグのほこりを取り除き、刃の根元まで確実に差込む

接続が不十分だと、隙間にほこりが付着して火災・感電の原因になります。

禁　止

本体を水につけたり、水をかけたりしない

ショート・感電の原因になります。

禁　止

使用時や使用直後（運転停止後約60分間）は、操作に関係のない部位には触れない

高温部に触れ、やけどの原因になります。

同梱の電源コード・電源プラグ以外のコード・プラグを使用しない

故障・火災・感電の原因になります。

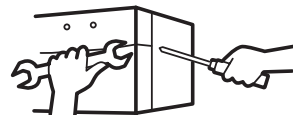
禁　止

電源コードを途中で接続しない、タコ足配線をしない

火災・感電・故障の原因になります。

禁　止

修理・分解・改造はしない

火災・感電の原因になります。

指定の規格

取扱説明書に指定された規格のコンセントを使用する

指定された規格以外で使用すると火災・感電の原因になります。

禁　止

電源コードや電源プラグが傷んだり、コンセントの差し込みがゆるいときは使わない

感電・ショート・発火の原因になります。

プラグを抜く

異常時は、運転を停止して電源プラグを抜く

異常のまま運転を続けると火災・感電の原因になります。

禁　止

同梱の電源コード・電源プラグを他の電気機器に使用しない

故障・火災・感電の原因になります。

注意

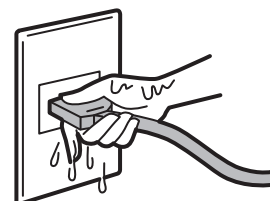
禁　止

設置時は、次のような場所には置かない

●不安定な場所　　●湿気やほこりの多い場所
●油煙や湯気が当たる場所
●直射日光の当たる場所　●風雨のあたる場所
●熱器具の近く　　　　　●高温になる場所
●吸・排気口をふさぐような場所

このような場所に置くと、ショートや発熱、電源コードの被膜が溶けるなどして、火災や感電、故障、変形の原因になることがあります。

禁　止

ぬれた手で電源プラグを抜き差ししない

感電の原因になります。

水平

水平で丈夫な場所に設置する

プラグを持つ

電源プラグを持ってまっすぐ引き抜く

ななめに引き抜いたり、コードを持って抜くと、プラグの刃や芯線が破損してショート・感電・発火の原因になります。

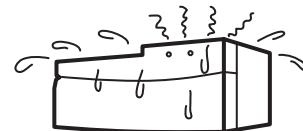
低温室で使用する場合の注意

電源を
入れておく

装置を低温環境下でご使用になる場合、システム電源は常時入れておく

低温環境下で長時間システムの電源を落とした状態で放置すると、結露などにより故障の原因になります。
ランプなどの消耗品は OFF にしておくと、劣化を防ぐことができます。

電源を
入れない

装置を低温室から常温の場所に移動させる場合、常温に設置後、装置内の結露が無くなるまでシステム電源を入れない（状況により異なるが、通常半日から一昼夜）

感電・漏電火災の原因になります。

弊社製品についてのお問合せ　（バイオダイレクトライン）

TEL：03-5331-9336

受付時間　9：00 ～ 17：30
土・日・祝日、弊社指定休業日、年末年始を除く